

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN**



**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON MATCHA (*Camellia sinensis*) SOBRE  
LA MARRONIZACIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO BLANCO EN RATAS WISTAR  
MACHO ALIMENTADAS CON DIETA DE CAFETERÍA**

**POR**

**M.C. ROBERTO CARLOS PÉREZ KAST**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN**

**ENERO 2022**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN**



**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON MATCHA (*Camellia sinensis*) SOBRE  
LA MARRONIZACIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO BLANCO EN RATAS WISTAR  
MACHO ALIMENTADAS CON DIETA DE CAFETERÍA**

TESIS

POR

M.C. ROBERTO CARLOS PÉREZ KAST

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN

DIRECTOR DE TESIS  
DR. HERIBERTO CASTRO GARCÍA

CODIRECTOR DE TESIS  
DR. MARCELO HERNÁNDEZ SALAZAR

MONTERREY, NUEVO LEÓN

ENERO DE 2022



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FaSPyN

Facultad de Salud Pública y Nutrición

**DRA. EN C. BLANCA EDELIA GONZÁLEZ MARTÍNEZ**

Subdirectora de Investigación, Innovación y Posgrado

Facultad de Salud Pública y Nutrición, UANL

Presente.

Por medio de la presente me permito comunicar a usted que hemos realizado las modificaciones pertinentes a la tesis titulada **“EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON MATCHA (*Camellia sinensis*) SOBRE LA MARRONIZACIÓN DEL TEJIDO ADIPOSEO BLANCO EN RATAS WISTAR MACHO ALIMENTADAS CON DIETA DE CAFETERÍA”** presentada por: **M.C. ROBERTO CARLOS PÉREZ KAST** con la finalidad de obtener el grado de **Maestría en Ciencias en Nutrición**.

Sin otro particular, le envío un cordial saludo.

Atentamente,

*“Alere Flammam Veritatis”*

Monterrey, N.L. 10 de septiembre de 2021

Dr. Heriberto Castro García  
Director de la Tesis

Dr. Marcelo Hernández Salazar  
Codirector de la Tesis

## COMITÉ DE EVALUACIÓN DE TESIS

El Comité de Evaluación de Tesis **APROBÓ** la tesis titulada “**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON MATCHA (*Camellia sinensis*) SOBRE LA MARRONIZACIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO BLANCO EN RATAS WISTAR MACHO ALIMENTADAS CON DIETA DE CAFETERÍA**” presentada por el M.C. Roberto Carlos Pérez Kast, con la finalidad de obtener el grado de Maestría en Ciencias en Nutrición.

Monterrey, Nuevo León a 17 de enero de 2022

---

**Dra. Vania Urías Orona**  
Presidente

---

**Dr. Heriberto Castro García**  
Secretario

---

**Dr. Marcelo Hernández Salazar**  
Vocal

## **APROBACIÓN DE TESIS DE MAESTRÍA**

### **EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON MATCHA (*Camellia sinensis*) SOBRE LA MARRONIZACIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO BLANCO EN RATAS WISTAR MACHO ALIMENTADAS CON DIETA DE CAFETERÍA**

---

**Dra. Vania Urías Orona**  
Presidente

---

**Dr. Heriberto Castro García**  
Secretario

---

**Dr. Marcelo Hernández Salazar**  
Vocal

---

**Dra. Blanca Edelia González Martínez**  
Subdirectora de Investigación, Innovación y Posgrado

## DEDICATORIA

**A mi familia**

Mi gran motivación para siempre salir adelante

*«La ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones  
y la fuente de vida de todo progreso»*

-Louis Pasteur

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por brindarme la beca que me permitió cursar satisfactoriamente el posgrado.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) y a la Facultad de Salud Pública y Nutrición (FaSPyN) por su gran calidad educativa y aceptarme como su estudiante.

Al Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS) de la UANL por facilitarme sus instalaciones para realizar esta investigación.

Al Dr. Heriberto Castro García por su gran disposición en todo momento para sus asesorías, enseñanzas y consejos, que no solo me hicieron crecer como estudiante, sino también como persona.

Al Dr. Marcelo Hernández Salazar por sus certeras opiniones y recomendaciones, que siempre llegaban en el momento más oportuno.

A la Dra. Vania Urías Orona por sus valiosas clases de seminario de tesis y observaciones que permitieron mejorar el proyecto.

A la Dra. Ana Laura de la Garza por su gran apoyo y disposición durante el desarrollo de la investigación.

A la M.Sc. Bianka Dianey Camacho Zamora por transmitirme sus vastos conocimientos sobre la extracción de ácidos nucleicos y PCR en tiempo real.

A mis amigos y compañeros de generación: Maripaz, Deisy, Estefanía, David, Cecilia y Andrea. A Mayela por ser tan responsable y formar un gran equipo durante el proyecto. A Victor por brindarme su amistad, confianza y apoyo en momentos difíciles.

A mis tías Huesca Eufrazio porque siempre están orgullosas y felices por mis logros.

A la gran doctora Lyssetta, por siempre darme ánimos, recordarme que yo puedo y contagiarme su alegría aun en la distancia.

A mis hermanos por cuidarme desde pequeño, por haberme enseñado mis primeras palabras y ser mis modelos a seguir.

Agradezco a mis padres porque siempre han dado todo por mi bienestar. Por asegurar mi educación e inculcarme la importancia de seguir aprendiendo.

Gracias a todos por creer en mi.

# CONTENIDO

<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>2</b>
<b>1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>3</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>5</b>
2.1 OBESIDAD .....	5
2.1.1 <i>Definición y clasificación.....</i>	5
2.1.2 <i>Epidemiología .....</i>	6
2.1.3 <i>Etiología.....</i>	7
2.1.4 <i>Fisiopatología.....</i>	7
2.1.5 <i>Tratamiento.....</i>	8
2.2 TEJIDO ADIPOSO .....	11
2.2.1 <i>Tejido adiposo blanco .....</i>	11
2.2.2 <i>Tejido adiposo marrón.....</i>	15
2.2.3 <i>Tejido adiposo beige .....</i>	16
2.3 MARRONIZACIÓN.....	17
2.3.1 <i>Expresión génica en la marronización .....</i>	18
2.4 MODELO ANIMAL .....	20
2.4.1 <i>Dieta de cafetería.....</i>	20
2.5 <i>CAMELLIA SINENSIS Y MATCHA .....</i>	21
<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>24</b>
<b>4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>25</b>
<b>5. HIPÓTESIS.....</b>	<b>25</b>
<b>6. OBJETIVOS .....</b>	<b>26</b>
OBJETIVO GENERAL .....	26
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
<b>7. METODOLOGÍA.....</b>	<b>27</b>
7.1 DISEÑO EXPERIMENTAL .....	27
7.2 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LA MUESTRA .....	29
7.2.1 <i>Criterios de inclusión .....</i>	29
7.2.2 <i>Criterios de exclusión .....</i>	29



7.2.3 Criterios de eliminación .....	29
7.3 DIETAS EXPERIMENTALES .....	29
7.4 GLUCEMIA PERIFÉRICA .....	30
7.5 EXPRESIÓN GÉNICA.....	31
7.5.1 Aislamiento de ARN .....	31
7.5.2 Análisis cuantitativo del ARN.....	33
7.5.3 Retrotranscripción .....	33
7.5.5 RT-qPCR .....	34
<b>8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>36</b>
<b>9. RECURSOS .....</b>	<b>37</b>
9.1 FINANCIEROS.....	37
9.2 HUMANOS .....	37
<b>10. CONSIDERACIONES ÉTICAS Y DE BIOSEGURIDAD .....</b>	<b>38</b>
<b>11. RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
11.1 OBJETIVO ESPECÍFICO 1 .....	39
11.1.1 Peso corporal e ingesta de alimento.....	39
11.1.2 Pesos de tejidos.....	41
11.1.3 Glucosa.....	43
11.2 OBJETIVO ESPECÍFICO 2 .....	43
11.2.1 Tejido adiposo epididimal.....	44
11.2.2 Tejido adiposo mesentérico.....	44
<b>12. DISCUSIÓN.....</b>	<b>48</b>
12.1 OBJETIVO ESPECÍFICO 1 .....	48
12.1.1 Peso corporal e ingesta de alimento.....	49
12.1.2 Pesos de tejidos.....	52
12.1.3 Glucosa.....	53
12.2 OBJETIVO ESPECÍFICO 2 .....	54
<b>13. CONCLUSIONES .....</b>	<b>58</b>
<b>14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>59</b>

## ABREVIATURAS

<b>ABg</b>	Adipocito Beige
<b>AC</b>	Adenilato ciclasa
<b><i>Actb</i></b>	$\beta$ -actina
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>AGL</b>	Ácidos grasos libres
<b>AgRP</b>	Proteína r-agouti
<b>AMPc</b>	Monofosfato de adenosina cíclico
<b>AMPK</b>	Proteína quinasa activada por monofosfato de adenosina
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina
<b>BMP7</b>	Proteína morfogénica ósea 7
<b>CAF</b>	Grupo cafetería
<b>CAF</b>	Grupo cafetería suplementada
<b><i>CebpA</i></b>	CCAAT / potenciador de la proteína de unión alfa
<b>CIDEA</b>	Efactor tipo DFFA inductor de muerte celular
<b>Cox8b</b>	Citocromo C oxidasa subunidad VIIIb
<b>CTR</b>	Grupo control
<b>DAG</b>	Dieta alta en grasa
<b>DAE</b>	Dieta alta en energía
<b>DM2</b>	Diabetes mellitus tipo 2
<b>EEM</b>	Error estándar de la media
<b>EGCG</b>	Epigallocatequina-3-O-galato
<b>ENSANUT</b>	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
<b>FDA</b>	<i>Food &amp; Drug Administration</i>
<b>g</b>	Gramos
<b>GLUT1</b>	Transportador de glucosa tipo 1

<b>GLUT4</b>	Transportador de glucosa tipo 4
<b>ICR</b>	<i>Institute of Cancer Research</i>
<b>IL-1</b>	Interleucina 1
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IMC</b>	Índice de masa corporal
<b>JAK2</b>	Janus quinasa 2
<b>Kcal</b>	Kilocaloría
<b>LepRs</b>	Receptor específico de leptina
<b>LETO</b>	<i>Long-Evans Tokushima Otsuka</i>
<b>LPL</b>	Lipoproteína lipasa
<b>LSH</b>	Lipasa sensible a hormona
<b>MAG</b>	Monoacilglicerol lipasa
<b>MAG</b>	Monoacilglicerol lipasa
<b>mg</b>	Miligramos
<b>mL</b>	Mililitros
<b>MMI</b>	Membrana mitocondrial interna
<b>ng</b>	Nanogramos
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>OID</b>	Obesidad inducida por la dieta
<b>OLEFT</b>	<i>Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty</i>
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>OP-1</b>	Proteína osteogénica-1
<b>PCR</b>	Reacción de polimerasa en cadena
<b>PGC-1<math>\alpha</math></b>	Coactivador 1 $\alpha$ del receptor activado por proliferador de peroxisomas
<b>PKA</b>	Proteína quinasa A
<b>POMC</b>	Pro-opiomelanocortina
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	Receptor activado por proliferador de peroxisomas gamma
<b>PQQ</b>	Pirroloquinolina quinona
<b>PRDM16</b>	Dominio PR 16
<b>RT-qPCR</b>	Reacción de polimerasa en cadena en tiempo real

<b>SD</b>	Sprague Dawley
<b>STAT3</b>	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
<b>TAB</b>	Tejido adiposo blanco
<b>TABg</b>	Tejido adiposo beige
<b>TABing</b>	Tejido adiposo blanco inguinal
<b>TABm</b>	Tejido adiposo blanco mesentérico
<b>TABpg</b>	Tejido adiposo blanco perigonadal
<b>TABsa</b>	Tejido adiposo blanco subcutáneo anterior
<b>TABsc</b>	Tejido adiposo blanco subcutáneo
<b>TABr</b>	Tejido adiposo blanco retroperitoneal
<b>TABv</b>	Tejido adiposo blanco visceral
<b>TAM</b>	Tejido adiposo marrón
<b>TAMax</b>	Tejido adiposo marrón axilar
<b>TAMc</b>	Tejido adiposo marrón cervical
<b>TAMi</b>	Tejido adiposo marrón interescapular
<b>TAMpv</b>	Tejido adiposo marrón paravertebral
<b>TAMs</b>	Tejido adiposo marrón subescapular
<b>TAMsc</b>	Tejido adiposo marrón supraclavicular
<b>TAG</b>	Triacilglicerol
<b>TAGL</b>	Triacilglicerol lipasa
<b><i>Tbx1</i></b>	Factor de transcripción de la caja T1
<b><i>Tmem26</i></b>	Proteína transmembrana 26
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>UCP-1</b>	Proteína desacoplante 1
<b>UDG</b>	Uracilo ADN glicosilasa
<b>VLDL</b>	Lipoproteína de muy baja densidad
<b><math>\beta_3</math>-AR</b>	Receptor $\beta_3$ -adrenérgico
<b><math>\mu</math>g</b>	Microgramos
<b><math>\mu</math>L</b>	Microlitros
<b><math>\mu</math>M</b>	Micromolar
<b><math>\mu</math>m</b>	Micrómetros

## RESUMEN

**Introducción:** El tejido adiposo beige (TABg) se origina del tejido adiposo blanco a través de un proceso inducible y reversible denominado marronización. El TABg posee capacidad termogénica, lo que implica un incremento del gasto energético, tomando relevancia en el contexto de obesidad. Ciertos compuestos presentes en alimentos pueden inducir la marronización. *Camellia sinensis* es una planta de la cual se produce el matcha, un tipo de té verde que posee cantidades relevantes de polifenoles. Existen estudios que han evaluado a *C. sinensis* y su efecto anti-obesidad, pero la información sobre matcha y marronización es limitada (Kiefer, 2016; Topuz *et al.*, 2014).

**Objetivo:** Evaluar el efecto de la suplementación con matcha (*C. sinensis*) sobre la marronización del tejido adiposo blanco en ratas Wistar macho alimentadas con dieta de cafetería.

**Metodología:** 15 ratas Wistar macho se distribuyeron aleatoria y equitativamente en tres grupos: control (CTR), cafetería (CAF) y cafetería suplementada (CAF SUP). A cada grupo se le administró durante 15 semanas una dieta específica: CTR pienso estándar, CAF dieta de cafetería, CAF SUP dieta de cafetería más 100 mg/kg/día de matcha orgánico. El peso de las ratas se registró 1 vez por semana y la ingesta 3 veces por semana. También, se determinó la glucemia capilar al final del bioensayo posterior a 12 horas de ayuno. Como marcadores genéticos de marronización se analizaron los genes *Bmp7*, *Pgc-1α* y *Prdm16* en los tejidos adiposos epididimal (TAe) y mesentérico (TA<sub>m</sub>), mediante RT-qPCR. Como gen constitutivo se empleó el gen *Actb*.

**Resultados:** El peso del grupo CAF fue significativamente mayor al del grupo CTR a partir de la semana 7, mientras que el grupo CAF SUP lo fue hasta la semana 11. Al final del bioensayo la ganancia de peso del grupo CAF SUP (411.02 ± 46.86 g) fue ligeramente superior al grupo CAF (408.32 ± 29.39 g), sin significancia. De igual manera, en la ingesta de alimento no se encontró diferencia entre los grupos CAF y CAF SUP. La glucemia fue más elevada en los grupos CAF y CAF SUP, 105.2 ± 8.35 y 108.8 ± 7.69 mg/dl, respectivamente, sin diferencia estadística. En TAe el gen *Pgc-1α* mostró inducción por mayor expresión relativa en el grupo CAF SUP. En TA<sub>m</sub> el gen *Prdm16* mostró mayor expresión en el grupo CAF SUP vs. CAF, sin diferencia estadística.

**Conclusiones:** La suplementación con 100 mg/kg/día de matcha no revierte el estado obesogénico ni hiperglucémico en ratas Wistar macho alimentadas con dieta de cafetería. Sin embargo, la menor ganancia de peso del grupo CAF SUP previo a la semana 11 y la inducción del gen *Pgc-1α* en TAe podrían sugerir que el matcha tiene un efecto antiobesogénico y puede inducir la marronización del tejido adiposo blanco. La dieta de cafetería, al generar mayores alteraciones en la homeostasis que las dietas comerciales, requiere de mayor suplementación para revertir o aminorar sus efectos.

## ABSTRACT

**Introduction:** Beige adipose tissue (BgAT) originates from white adipose tissue through an inducible and reversible process called browning. BgAT has thermogenic capacity, which implies an increase in energy expenditure, taking relevance in obesity context. Certain compounds present in food can induce browning. *Camellia sinensis* is a plant from which matcha is produced, a type of green tea that has significant amounts of polyphenols. There are some studies that have evaluated *C. sinensis* and its anti-obesity effect, but information about matcha and browning is limited (Kiefer, 2016; Topuz *et al.*, 2014).

**Aim:** Evaluate the effect of matcha supplementation (*C. sinensis*) on white adipose tissue browning in male Wistar rats fed with cafeteria diet.

**Methods:** 15 male Wistar rats macho were randomly and evenly distributed into three groups: control (CTR), cafeteria (CAF) and supplemented cafeteria (CAF SUP). Each group was given a specific diet for 15 weeks: CTR standard diet, CAF cafeteria diet, CAF SUP cafeteria diet and 100 mg/kg/día of organic matcha. The weight of the rats was recorded once a week and the food intake 3 times per week. Also, capillary glycemia was determined at the end of the bioassay after 12 hours of fasting. As genetic markers of browning, the genes *Bmp7*, *Pgc-1α* y *Prdm16* were analyzed in the epididymal (eAT) and mesenteric (mAT) adipose tissues, by RT-qPCR. The constitutive gene used was the *Actb* gene.

**Results:** The weight of the CAF group was significantly higher than that of the group CTR from week 7 while the CAF SUP group was until week 11. At the end of the bioassay the weight gain of the CAF SUP group ( $411.02 \pm 46.86$  g) was slightly higher than the CAF group ( $408.32 \pm 29.39$  g), no significance. Similarly, in food intake, no difference was found between the CAF and CAF SUP groups. Glycemia was higher in the CAF and CAF SUP groups,  $105.2 \pm 8.35$  and  $108.8 \pm 7.69$  mg/dl, respectively, with no statistical difference. In eAT the *Pgc-1α* gene showed induction by higher relative expression in the CAF SUP group. In mAT the *Prdm16* gene showed higher expression in the CAF SUP group vs. CAF, no statistical difference.

**Conclusions:** Supplementation with 100 mg/kg/day of matcha does not reverse obesogenic or hyperglycemic status in male Wistar rats fed with cafeteria diet. However, the lower weight gain of the CAF SUP group prior to week 11 and induction of the *Pgc-1α* gene in eAT, might suggest that matcha has an antiobesogenic effect and can induce the browning of white adipose tissue. Cafeteria diet, by generating greater alterations in homeostasis than commercial diets, requires more supplementation to reverse or lessen its effects.

# 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La obesidad es la enfermedad de índole nutricional con mayor prevalencia en la población mundial. En los últimos años, las tasas de obesidad se han incrementado, representando una verdadera pandemia con graves repercusiones en la salud (Malik *et al.*, 2013). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2016 se registraron 1.9 billones de adultos con peso por encima del límite normal, de los cuales 650 millones presentaban obesidad (WHO – “Obesity and overweight”, 2018).

Si bien la alimentación es un elemento que influye en la patogenia de la obesidad, existe otros factores involucrados, como factores genéticos y culturales (Pérez *et al.*, 2012); lo cual la convierte en una enfermedad compleja. La obesidad aumenta el riesgo de desarrollar comorbilidades como síndrome metabólico, hígado graso no alcohólico, enfermedades cardiovasculares y cáncer.

El estrés oxidativo y la inflamación se encuentran estrechamente relacionados con la obesidad, aunque no se ha establecido la secuencia temporal de su vínculo (Warolin *et al.*, 2014). No obstante, la evidencia científica sugiere que el estrés oxidativo puede establecer la conexión entre la obesidad y sus complicaciones (Savini *et al.*, 2013).

En las últimas décadas se han desarrollado estrategias dietéticas, farmacológicas y quirúrgicas para la prevención y tratamiento de la obesidad. Aunque las intervenciones farmacológicas y quirúrgicas son a menudo efectivas en la disminución del peso corporal, están ligadas con mayor frecuencia a distintos efectos adversos, además de tener altos costos. En este sentido, la intervención nutricional es una opción más viable, y debe considerarse desde las primeras instancias del tratamiento de la obesidad (Huang *et al.*, 2014).

Varios estudios han evaluado alimentos de origen vegetal con potencial terapéutico contra la obesidad (Gamboa *et al.*, 2015). En el té verde, y otros extractos de la planta *Camellia sinensis*, se han estudiado efectos sobre el tejido adiposo blanco que contribuyen a la disminución del peso corporal, como la inhibición de la adipogénesis, aumento de la lipólisis, elevación de la oxidación de

ácidos grasos, desarrollo de capacidad termogénica e incremento del gasto energético (Chen *et al.*, 2017).

Los compuestos de mayor interés biológico encontrados en *Camellia sinensis* son los polifenoles, donde las catequinas son la clase más predominante. De éstas, la más abundante es la (-)-epigallocatequina-3-O-galato (EGCG) (Oz, 2017). El té verde tiene una composición más alta de catequinas comparado con otros tipos de té, como el té negro y el oolong. El matcha es un tipo de té verde obtenido tras la pulverización de hojas que pasaron por un periodo de sombreado parcial, previo a su recolección. En Japón y otras regiones orientales, el matcha constituye la forma tradicional de consumo de esta planta, en forma de bebida caliente (Willems *et al.*, 2020).

La cantidad de compuestos bioactivos consumidos, incluyendo las catequinas, es mayor en el matcha que en las infusiones de té verde ( $87.63 \pm 4.9$  mg/g y  $17.22 \pm 0.08$  mg/g de catequinas, respectivamente), ya que la bebida posee tanto los compuestos solubles como los insolubles en agua (Weiss y Anderton, 2003). Sin embargo, existen muy pocos estudios que han examinado los efectos positivos del matcha a nivel metabólico, y no se cuenta con información relacionada al proceso de marronización del tejido adiposo blanco y su impacto en la obesidad (Xu *et al.*, 2016).



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Obesidad

#### 2.1.1 Definición y clasificación

En la actualidad, la obesidad está reconocida como una enfermedad crónica no transmisible, caracterizada por la acumulación excesiva de grasa corporal, que incrementa riesgos a la salud (Purnell *et al.*, 2018; Manna y Jain, 2015). En las últimas cuatro décadas, la obesidad ha pasado de ser un problema limitado a países y sociedades desarrolladas, a un importante problema de salud pública mundial más generalizado (Seidell y Halberstadt, 2015).

El índice de masa corporal (IMC), creado por Quetelet, es una razón matemática entre el peso y estatura de un individuo empleada en antropometría. En 1995, la OMS unificó las categorías del IMC (Tabla 1). De este modo, se habla de obesidad cuando el individuo posee un valor  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup> de IMC (Nuttall, 2015). Aunque el IMC es un referente ampliamente utilizado, tiene la limitante de no diferenciar entre la masa magra y la masa grasa, por lo que una persona puede tener un IMC de peso normal y aun así tener una masa grasa alta (Flegal *et al.*, 2009).

Categorías	IMC
Bajo peso	$< 18.5$ kg/m <sup>2</sup>
Peso normal	18.5 - 24.9 kg/m <sup>2</sup>
Sobrepeso	25 - 29.9 kg/m <sup>2</sup>
Obesidad grado I	30 - 34.9 kg/m <sup>2</sup>
Obesidad grado II	35.0 - 39.9 kg/m <sup>2</sup>
Obesidad grado III	$\geq 40$ kg/m <sup>2</sup>

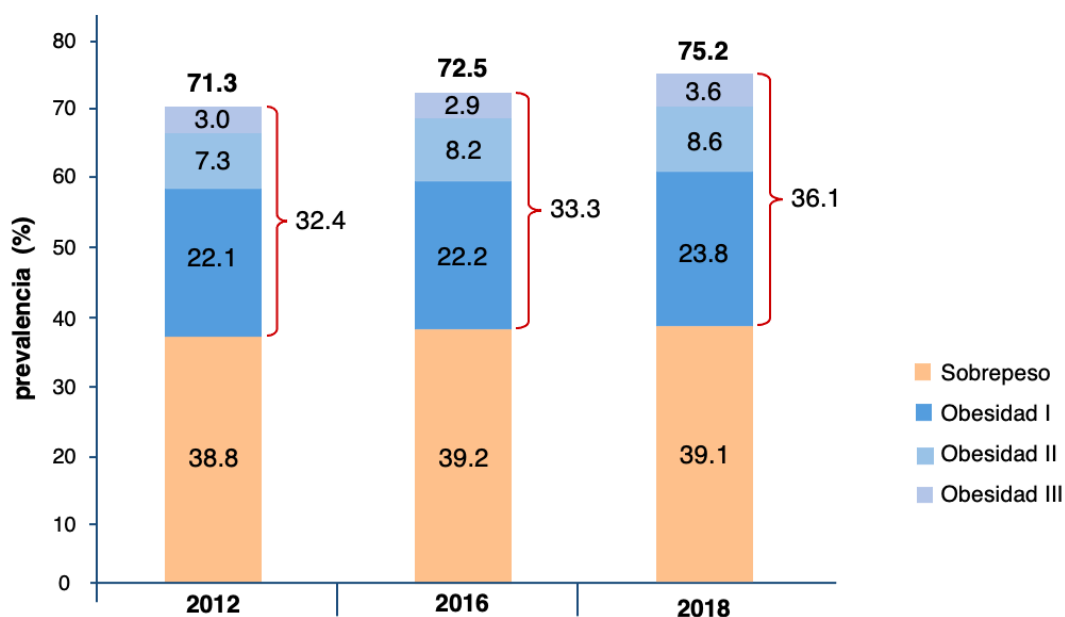
**Tabla 1.** Clasificación del IMC según la OMS.

### 2.1.2 Epidemiología

La Organización Mundial de la Salud estimó que en el año 2016, más de 1.9 billones de adultos (mayores de 18 años de edad) presentaban sobrepeso, representando el 39% de la población mundial. De ellos, más de 650 millones padecían de obesidad, alrededor del 13% de la población. La prevalencia de obesidad se ha triplicado desde 1975 a la fecha (WHO, 2016).

En México, la Encuesta Nacional de Salud (ENSANUT) 2018-19 ha reportado que la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad fue de 75.2% en adultos de 20 y más años de edad (Figura 1). La prevalencia es mayor en las mujeres (76.8%) que en los hombres (73.0%).

La obesidad está presente en más de una tercera parte de la población adulta en el país (36.1%). Es también más alta en el género femenino (40.2%) que en el masculino (30.5%). En las zonas urbanas, la obesidad es más prevalente que en las rurales (37.2% vs 32.0%, respectivamente). La región norte del país es donde la población adulta presenta la mayor prevalencia de obesidad, con el 41.6% (ENSANUT, 2020).



**Figura 1.** Prevalencia de sobrepeso y obesidad a nivel nacional en población de 20 años o más de edad. Tomado de ENSANUT (2020).

### 2.1.3 Etiología

El aumento de la deposición de grasa, abordado de una manera simple, es resultado de un desequilibrio entre la ingesta calórica y el gasto energético. En este sentido, la obesidad es consecuencia de la baja actividad física (sedentarismo) y el consumo excesivo de alimentos por encima de las necesidades energéticas del individuo. Sin embargo, la obesidad es más compleja (Sellayah *et al.*, 2014).

El nivel socioeconómico, agentes medioambientales, comportamientos personales, la microbiota intestinal y las interacciones genotipo-fenotipo deben ser tomados en cuenta para entender a la obesidad de una manera más completa. Todos estos factores afectan la ingesta de alimento, gasto energético, recambio de nutrientes, oxidación de ácidos grasos y su depósito en tejido adiposo y no adiposo (Bhupathiraju y Hu, 2016).

La obesidad muestra marcada heterogeneidad entre individuos y los depósitos de grasa pueden diferir en localización. Con ello, se distinguen dos clases de obesidad, la subcutánea y la visceral. En la obesidad subcutánea, el exceso de grasa se encuentra alrededor de la cadera y muslos, dando apariencia de pera al cuerpo y es más común en mujeres. La obesidad visceral afecta principalmente al tejido adiposo mesentérico, donde la grasa se concentra en la región abdominal (cuerpo en forma de manzana), y es más común en hombres (González *et al.*, 2017).

### 2.1.4 Fisiopatología

Cuando el suministro de energía excede la capacidad de almacenamiento de los adipocitos, estos se hipertrofian, es decir, aumentan su tamaño. La hipertrofia conlleva a una mayor liberación de adipoquinas proinflamatorias, tales como la interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), que dan como resultado inflamación crónica de bajo grado. Esta serie de eventos inicialmente se limita al tejido adiposo, pero eventualmente llega a la circulación sistémica, involucrando más tejidos y órganos (Francisqueti *et al.*, 2017).

Una de las primeras consecuencias del estado inflamatorio inducido por la obesidad es la resistencia a la insulina, ya que el TNF- $\alpha$  impide la fosforilación del

receptor de insulina, interfiriendo con la posterior cascada de reacciones necesarias para su función (Andrade *et al.*, 2015).

El estrés oxidativo puede ser desencadenado por los adipocitos. Inicialmente el incremento de masa grasa disminuye la irrigación sanguínea, baja el aporte de oxígeno y finalmente ocurre necrosis adipocitaria. La fagocitosis, necesaria para eliminar las células muertas, resulta en liberación de moléculas prooxidantes como el óxido nítrico y el peróxido de hidrógeno, además de infiltrado celular inflamatorio (Battacharya *et al.*, 2015).

El mecanismo involucrado en la patogenia de las complicaciones de la obesidad, como la diabetes mellitus tipo 2 y enfermedades cardiovasculares, no ha sido aclarado por completo. No obstante, hay evidencia creciente que apunta a la presencia del estado inflamatorio crónico de bajo grado como el responsable. Dada la mayor presencia de moléculas proinflamatorias (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , etc.) y estrés oxidativo, se genera un efecto citotóxico que altera la estructura y función tisular en tejido adiposo, endotelio vascular, hígado, riñón, entre otros órganos (Dudla *et al.*, 2019).

### **2.1.5 Tratamiento**

La etiología multifactorial de la obesidad requiere de un abordaje terapéutico integral. Actualmente existen varias alternativas que pueden englobarse en los tratamientos dietéticos, farmacológicos y quirúrgicos.

Los cambios en el estilo de vida que incluyen mejora de la dieta y actividad física regular, continúan siendo la piedra angular en el tratamiento de la obesidad. Las intervenciones en el estilo de vida ayudan a los pacientes a monitorizar y comprender su comportamiento alimenticio, además de reconocer los factores que influyen en el tipo de alimentación, las complicaciones y los beneficios de modificarla (Seidell y Halberstadt, 2015).

#### **2.1.5. A) Dietético**

El balance energético negativo mediante la restricción calórica es una estrategia comúnmente utilizada para la pérdida de masa grasa. De manera

general, se recomienda una restricción de 500 kcal por día, generando un déficit semanal de 3500 kcal, lo que equivale a la energía almacenada en 450 g de tejido adiposo. También, se utiliza la prescripción general de 1200 kcal por día para mujeres y 1500 kcal por día para hombres, pero esto puede individualizarse para disminuir en un 30% la ingesta energética total. Por otro lado, mejorar la calidad nutricional general sin una restricción energética directa, también es útil en la reducción de peso corporal (Mozaffarian, 2016).

Para mantener esta reducción de peso a largo plazo es importante la adherencia al programa dietético. Además, la proporción de los macronutrientes es relevante. El consumo alto de proteínas, alimentos con bajo índice glucémico y consumo bajo de grasas pueden ser benéficos para el mantenimiento de la pérdida de peso (Bray y Siri, 2016).

Las recomendaciones dietéticas para el control de peso deben considerar la calidad general de la dieta y los efectos a largo plazo en la salud, así como el rol de aminoácidos específicos, ácidos grasos, compuestos bioactivos, o el número de comidas, el horario de consumo y la distribución de los macronutrientes (de la Iglesia *et al.*, 2016).

#### **2.1.5 B) Farmacológico**

En las décadas pasadas los únicos dos fármacos aprobados por la FDA para la pérdida de peso eran la sibutramina y la tetrahidrolipstatina (orlistat). La sibutramina fue retirada del mercado por aumentar el riesgo cardiovascular, pero el orlistat actualmente sigue empleándose, además existen otros tratamientos aprobados.

El orlistat promueve la pérdida de peso por inhibición de las lipasas gastrointestinales, de este modo disminuye la absorción de grasas hasta en un 30%. Los individuos que consumen orlistat tienen niveles séricos significativamente más bajos de vitaminas liposolubles y deben recibir suplementación. Otros efectos secundarios son la esteatorrea, flatulencias e incontinencia fecal, y son la principal razón de los pacientes para discontinuar el tratamiento (Kumar y Kelly, 2017).

La fentermina asociada con topiramato fue aprobada por la FDA en 2012 como tratamiento a largo plazo de la obesidad en adultos con IMC  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup> o  $\geq 27$  kg/m<sup>2</sup> con al menos una comorbilidad relacionada. La fentermina promueve la pérdida de peso al disminuir el paso de noradrenalina a los núcleos hipotalámicos, con efecto anorexígeno. El topiramato, usado en epilepsia y profilaxis de migraña, provoca aversión al sabor de los alimentos, disminuyendo la ingesta calórica. La fentermina/topiramato aumenta el riesgo de acidosis metabólica y el desarrollo de litiasis renal en pacientes predispuestos (Fujioka, 2015).

En años recientes se ha llevado a cabo el desarrollo de fármacos agonistas del receptor  $\beta_3$ -adrenérgico ( $\beta_3$ -AR), el cual es muy abundante en el tejido adiposo marrón maduro y su estimulación incrementa la acción termogénica de este tejido con aumento del gasto energético. Uno de los fármacos que está en prueba es el CL 316243 que posee alta especificidad por el  $\beta_3$ -AR (Richard *et al.*, 2017).

Si bien la medicación puede ser útil en el tratamiento de la obesidad, su eficacia está limitada a una pérdida de peso del 5 al 10% en la mayoría de los pacientes. Por lo tanto, el tratamiento farmacológico no debe ser visto como la única medida para combatir la enfermedad (Kumar y Kelly, 2017).

### **2.1.5 C) Quirúrgico**

La cirugía bariátrica es una modalidad efectiva para la pérdida y mantenimiento de peso en pacientes con obesidad severa. Sin embargo, debido a su costo, poca accesibilidad y preocupación por los efectos adversos, su uso está limitado a solo una fracción de los candidatos. La gastrectomía vertical en manga es el procedimiento quirúrgico bariátrico más comúnmente realizado en la actualidad. Una de sus complicaciones es el desarrollo de reflujo gastroesofágico severo, que para ser resuelto necesita de una reintervención donde se realiza una derivación (*bypass*) en Y de Roux.

Otra alternativa quirúrgica es la banda gástrica ajustable, un procedimiento laparoscópico reversible. No obstante, se necesitan de revisiones periódicas por el riesgo de complicaciones metabólicas por deficiencias de minerales, secundario a

disminución de la ingesta alimentaria, vómito o malabsorción (Heymsfield *et al.*, 2018).

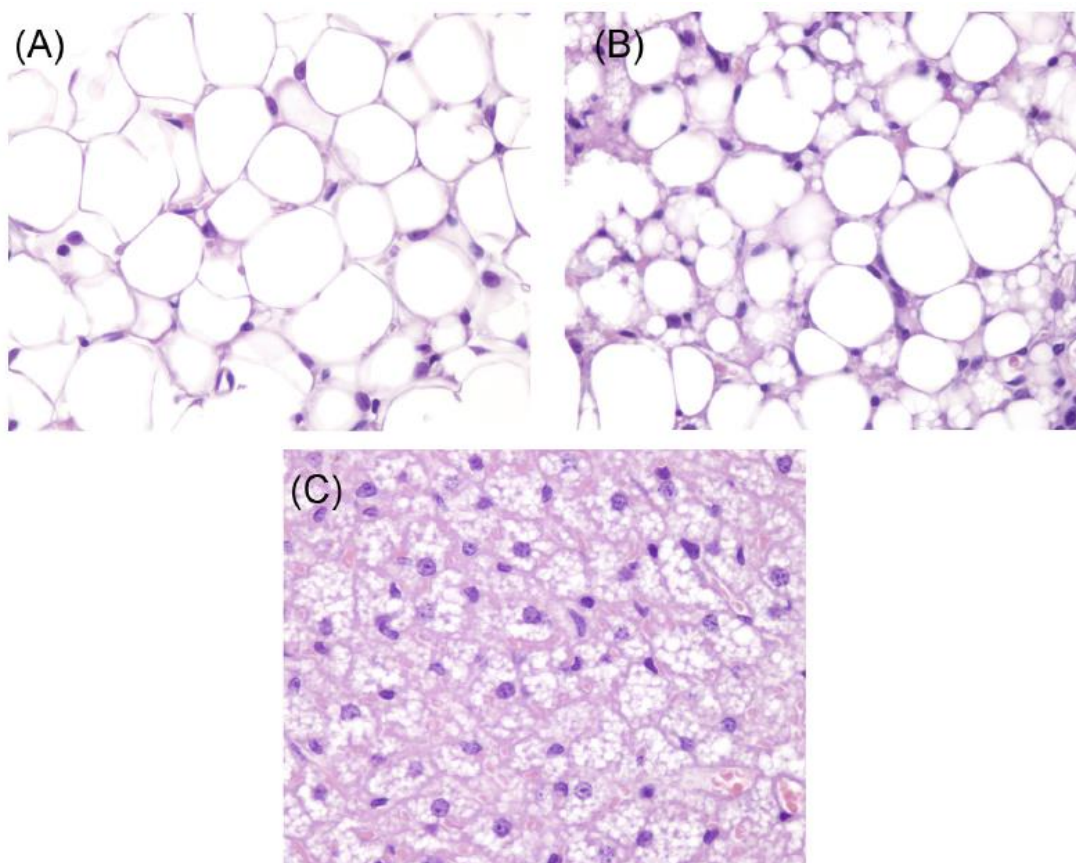
## **2.2 Tejido adiposo**

El tejido adiposo posee distintas características histológicas y ejerce diversas funciones. En los mamíferos existen tres tipos de tejido adiposo: tejido adiposo blanco (TAB), tejido adiposo marrón (TAM) y tejido adiposo beige (TABg) (Marcadenti y Abreu, 2015).

### **2.2.1 Tejido adiposo blanco**

El TAB está conformado por adipocitos blancos, unidos por tejido conectivo laxo altamente vascularizado e innervado. La principal característica morfológica de los adipocitos blancos maduros es la presencia de una gran gota lipídica “unilocular” que ocupa más del 90% del volumen celular (Figura 2 A). El citoplasma se dispone como una fina capa, y posee baja densidad mitocondrial. Tienen forma esférica y su diámetro va de un mínimo de 30-40  $\mu\text{m}$  a un máximo de 150-160  $\mu\text{m}$  (Torres *et al.*, 2016). El TAB es un tejido muy dinámico, representa menos del 5% del peso corporal en algunas personas y más del 60% en otras, de modo que tiene una capacidad excepcional de cambio de masa incluso en el mismo individuo (Berry *et al.*, 2014).

En el cuerpo, el TAB se distribuye en distintos depósitos. Para su estudio se les ha dividido en dos tipos, el tejido adiposo blanco visceral (TABv) y el tejido adiposo blanco subcutáneo (TABsc). El TABv incluye a los depósitos omental, mesentérico, retroperitoneal, gonadal y pericárdico; su exceso está asociado a desórdenes metabólicos y enfermedades cardiovasculares. El TABsc se encuentra ampliamente distribuido en varios lugares debajo de la piel. En humanos existen depósitos de TABsc en regiones del cuerpo superior (abdomen profundo y superficial) e inferior (gluteofemoral) (Kwok *et al.*, 2016; Tchkonja *et al.*, 2013).



**Figura 2.** Tinción de hematoxilina y eosina representativa del (A) tejido adiposo blanco, (B) beige, y (C) marrón de rata (Kiefer, 2016).

Los depósitos de TAB se pueden asociar estrechamente con otros órganos o regiones anatómicas de manera fisiológica, donde asumen funciones diferentes a las tradicionales. En la piel, glándulas mamarias y médula ósea, el tejido adiposo tiene la función de modular el crecimiento y regeneración celular, mediante señalización parácrina (Zwick *et al.*, 2018).

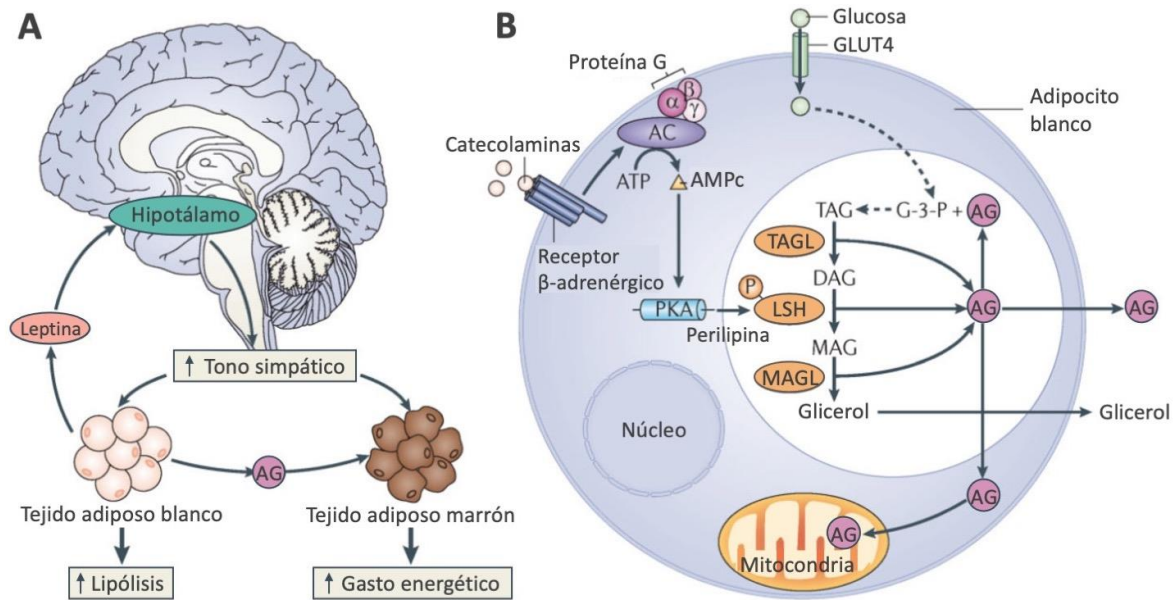
La distribución del TAB varía considerablemente según el género, entre individuos del mismo género, la edad, estados patológicos y en respuesta a fármacos y hormonas (Sánchez *et al.*, 2016).

La principal función del TAB es el mantenimiento de la homeostasis energética. Cuando el balance energético es positivo, puede almacenar el excedente como triacilgliceroles (TAG), mediado por la lipoproteína lipasa (LPL).



Esto previene el depósito ectópico de lípidos, que traería efectos adversos. La LPL se encuentra unida al endotelio vascular, e hidroliza los TAG transportados por los quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) en el torrente sanguíneo. De esta forma, los ácidos grasos libres (AGL) y monoacilglicerol (MAG) resultantes pueden entrar y ser almacenado en el adipocito (Kwok *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2014).

En un balance energético negativo, el sistema nervioso simpático y las catecolaminas estimulan la lipólisis (Figura 3) para la liberación de AGL y glicerol a la circulación. La leptina, liberada por el TAB, incrementa el gasto energético al actuar en centro hipotalámicos que incrementan el tono simpático. La adrenalina y noradrenalina, al unirse al receptor  $\beta$ -adrenérgico del adipocito, activan una proteína quinasa A (PKA) a través del monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), que fosforila a la perilipina permitiendo la acción de la lipasa sensible a hormona (LSH), iniciando la lipólisis en la gota lipídica (Luo y Liu, 2016).



**Figura 3.** A.- Regulación de la lipólisis. B.- Lipólisis en el adipocito blanco. AC, adenilato ciclasa; AG, ácidos grasos; DAG, diacilglicerol; G-3-P, glicerol-3-fosfato; GLUT4, transportador de glucosa tipo 4; MAGL monoacilglicerol lipasa; TAGL, triacilglicerol lipasa. Adaptado de Altarejos & Montminy, (2011).

La insulina, en un estado energético alto, inhibe la acción de la lipasa sensible a hormona al reducir los niveles de AMPc y la actividad de la proteína quinasa A. Asimismo, la insulina mediante el GLUT4 permite la entrada de glucosa al adipocito empleada para la síntesis de ácidos grasos y TAG (lipogénesis). Por otro lado, los niveles plasmático elevados de glucagón durante el ayuno también son responsables de la activación de la proteína quinasa A dependiente de AMPc (Zechner *et al.*, 2012).

Además de su función energética, el TAB también es reconocido como un órgano endócrino muy activo. Las adipoquinas, son las citocinas producidas y secretadas por el tejido adiposo. Éstas ejercen una amplia variedad de funciones sobre la regulación metabólica, inmunológica e inflamatoria (Fasshauer *et al.*, 2015).

La leptina, descubierta en 1994, fue la primera adipoquina identificada. Es un péptido constituido por 167 aminoácidos. Está codificada por el gen *ob*, expresado principalmente en el TAB y en menor grado por el TAM y otros tejidos. La leptina ejerce sus funciones al unirse al receptor específico de leptina (LepRs) localizado en el sistema nervioso central (Cortese *et al.*, 2019). Su unión con el receptor LepRs activa las vías de señalización de la Janus quinasa 2 (JAK2) y del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3), regulando la homeostasis energética por inhibición de neuronas orexigénicas (Park y Ahima, 2015).

La adiponectina es la adipoquina más abundante. Es un péptido formado por 244 aminoácidos codificado por el gen *Adipo Q*. Existen tres receptores para la adiponectina, AdipoR1, AdipoR2 y T-cadherina. El primero, tiene una distribución generalizada en el organismo, pero es más abundante en el músculo esquelético. El receptor AdipoR2 se expresa predominantemente en el hígado, siendo el principal órgano blanco de la leptina. Los efectos hepáticos de la adiponectina incluyen el aumento de la sensibilidad a la insulina y reducción de la expresión de enzimas gluconeogénicas como la fosfoenolpiruvato quinasa y la glucosa-6-fosfatasa, mediante la activación de la AMPK (Achari y Jain, 2017).

Otras adipoquinas expresadas en menor cantidad por el TAB son la resistina, que disminuye la producción de adiponectina y aumenta la de citocinas inflamatorias; el TNF- $\alpha$ , la IL-1 $\beta$  e IL-6, que poseen actividad proinflamatoria; la vaspina, con actividad reguladora de la glucemia y de la ingesta de alimentos; y la apelina, con actividad regulatoria sobre la lipólisis, secreción de insulina y vasodilatación (Zhao *et al.*, 2019; Fasshauer *et al.*, 2015).

### **2.2.2 Tejido adiposo marrón**

En 1551, el naturalista suizo Konrad Gessner fue el primero en describir el tejido adiposo marrón en la región interescapular de marmotas. La identificación en humanos del TAM fue hasta principios del siglo XX. En un inicio se creía que el TAM era activo solo durante la hibernación, pero su presencia en animales que no hibernan y humanos contrastaba con tal suposición. Fue hasta la década de los 60 cuando se evaluó su capacidad termogénica, desempeñando un rol en la regulación de la temperatura corporal (Lidell *et al.*, 2014).

En roedores y humanos, el TAM se concentra en depósitos discretos estratégicamente agrupados en regiones con alto flujo sanguíneo (Figura 4). En ratones los mayores depósitos se encuentran en las regiones interescapular, subescapular y cervical. Depósitos menores están presentes a nivel del hilio renal y alrededor de la aorta (de Jong *et al.*, 2015). En humanos, los neonatos poseen un gran depósito de TAM interescapular, que va desapareciendo conforme avanza la edad. Sin embargo, existe evidencia que sugiere que hay un incremento de actividad del TAM en la adolescencia, especialmente durante la maduración sexual y el desarrollo musculoesquelético. En adultos existen pequeños grupos de TAM a nivel cervical, supraclavicular y paravertebral (Shinoda *et al.*, 2015; Ponrartana *et al.*, 2013).

Los adipocitos marrones poseen varias características distintivas que los diferencian de los adipocitos blancos. También poseen lípidos en su interior, pero estos se distribuyen en numerosas pequeñas gotas (multilocular) en lugar de una gran gota como en el TAB (Figura 2 C). Presentan abundantes mitocondrias y una alta expresión de la proteína desacoplante 1 o UCP-1 (*uncoupling protein-1*).

La UCP-1 es una proteína integral encontrada en la membrana mitocondrial interna (MMI) perteneciente a la superfamilia SLC25 de transportadores de solutos mitocondriales. Cuando está activa, desacopla la formación de ATP en la cadena respiratoria, por lo que los equivalentes reductores se disipan en forma de calor. A este proceso se le denomina termogénesis (Sánchez *et al.*, 2016).

El cuerpo parece tener solo unas cuantas reacciones termogénicas ajustables que existen de manera específica para la producción de calor y constituyen la termogénesis adaptativa. La fuga de  $H^+$  a través de MMI en el TAM es la principal responsable de la termogénesis adaptativa. Esta fuga disipa un gradiente electroquímico de  $H^+$  ( $\Delta\Psi$ ) a través de la MMI y lo convierte en calor a expensas de la producción mitocondrial de ATP. La pérdida mitocondrial de  $H^+$  en el TAM está mediada por la UCP-1 (Bertholet y Kirichok, 2017).

El TAM posee un consumo elevado de glucosa (por expresión elevada del GLUT1) y de AGL, que sirven como sustrato adicional para la termogénesis. Investigaciones han demostrado que el TAM también puede regular la homeostasis de glucosa y la sensibilidad a la insulina en ratones (Stanford *et al.*, 2013).

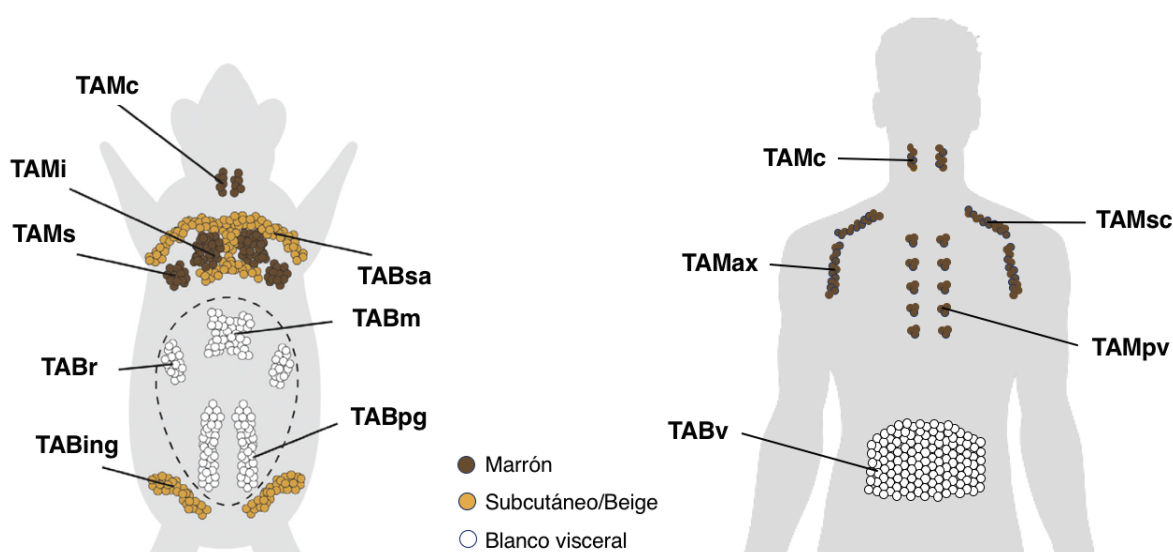
### **2.2.3 Tejido adiposo beige**

Los adipocitos beige (ABg) o “brite” (*brown-like-in-white*) tienen características morfológicas tanto de los adipocitos blancos como marrones (Figura 2 B). Poseen núcleo central y mayor cantidad de mitocondrias que el TAM. La distribución de las gotas lipídicas es multilocular, pero con mayor variabilidad en el tamaño de dichas gotas. Los ABg se localizan dentro de los depósitos de TAB, en roedores principalmente a nivel inguinal (los más estudiados) (Kiefer, 2016; Sánchez *et al.*, 2016).

Estos adipocitos surgen por señales o factores externos, como la estimulación de la actividad simpática durante la exposición crónica al frío, la administración de fármacos agonistas del  $\beta_3$ -AR, el ejercicio o compuestos bioactivos de ciertos alimentos. En humanos aún no se sabe con certeza si existe algún precursor de los adipocitos relacionado con la diferenciación hacia adipocito

beige, ni si tal proceso es realmente un fenómeno fisiológico (Mulya y Kirwan, 2016).

La función primaria de los ABg es la generación de calor para la regulación de la temperatura corporal. El TABg puede expresar niveles de UCP-1 similares a los del TAM, sin embargo, en roedores la cantidad de UCP-1 en todo el tejido adiposo inguinal es mucho más baja que la de todo el TAM, lo que indica que la mayor parte de la termogénesis ocurre en el TAM (Kaisanlahti y Glumoff, 2019).



**Figura 4.** Distribución anatómica de los principales depósitos de tejido adiposo en rata y humano. Marrón: TAMc, cervical; TAMi, interescapular; TAMs, subescapular; TAMsc, supraclavicular; TAMax, axilar; TAMpv, paravertebral; subcutáneo/beige: TABsa, subcutáneo anterior; TABing, inguinal; blanco visceral: TABm, mesentérico; TABr, retroperitoneal; TABpg, perigonadal; TABv, visceral. Adaptado de Sánchez *et al.* (2016).

## 2.3 Marronización

Al proceso de formación de TABg a partir del TAB se le conoce como marronización. En roedores, ocurre predominantemente en el TAB inguinal y subcutáneo, aunque también se ha demostrado que el TABv puede experimentar una marcada remodelación termogénica. A este fenómeno se le ha asociado con

protección contra la obesidad, debido al gasto de energía química significativamente mayor por incremento de la oxidación de ácidos grasos y glucosa para la generación de calor (Kiefer, 2016).

Un sello distintivo en la marronización es la presencia de la proteína UCP-1 en los ABg dentro de los depósitos de TAB. El proceso de marronización, y por consiguiente la termogénesis, puede ser estimulada por factores externos como exposición al frío, medicación y ejercicio físico (Contreras *et al.*, 2016).

Se han identificado compuestos bioactivos en alimentos de origen vegetal que, a través de mecanismos epigenéticos, como la regulación de microARNs, pueden inducir la marronización del TAB. Polifenoles como la quercetina, las isoflavonas y la EGCG se han relacionado con la expresión de diversos microARNs involucrados en las vías de marronización del TAB (Lorente *et al.*, 2019).

El núcleo arqueado hipotalámico juega un rol importante en la marronización del TAB a través de las neuronas pro-opiomelanocortina (POMC), sensibles a la señalización sinérgica de la insulina y la leptina. Por otro lado, la estimulación de las neuronas AgRP (proteína r-agouti) suprime la marronización del TAB. La inflamación hipotalámica, que ocurre en la obesidad, deteriora la señalización de la leptina e insulina en este tejido, consecuentemente, puede disminuir el proceso de marronización (da Cruz *et al.*, 2018).

### **2.3.1 Expresión génica en la marronización**

Los ABg tienen una firma genética muy similar a los adipocitos blancos en condiciones basales. No obstante, en respuesta a estimulación con agonistas adrenérgicos, u otros factores, la expresión de marcadores genéticos del TAM se ve inducida en los ABg. Por ende, las características funcionales y moleculares de los adipocitos marrones son reproducidas.

La expresión de varios genes termorreguladores como *Ucp-1*, *Cidea* (Cell Death-Inducing DFFA-Like Effector A) o el *Cox8b* (Citocromo C Oxidase Subunit VIIIb), ha sido empleada para evaluar la inducción de la transformación de TAB en TABg (García *et al.*, 2016).

Los adipocitos beige expresan marcadores genéticos únicos tal como *Tbx1*, *Tmem26* y *Cd137*, que no son expresados por los adipocitos blancos, ni por los adipocitos marrones (Stanford *et al.*, 2015). Sin embargo, aún no está claro si el empleo de estos marcadores para medir el grado de marronización en el TAB, es más preciso que la evaluación de la transcripción de los genes termorreguladores.

La proteína quinasa p38 activada por mitógenos (p38 MAPK) constituye una importante vía identificada en marronización. Esta puede ser inducida por distintas moléculas como la irisina, el péptido natriurético auricular y la proteína morfogénica ósea 7 (BMP7) (Lonzetti *et al.*, 2017). La BMP7, también llamada proteína osteogénica-1 (OP-1) actúa como un mediador autócrino inductor de la marronización (Klusóczy *et al.*, 2019).

Tras la activación de la p38 MAPK, se induce al coactivador 1 $\alpha$  del receptor activado por proliferador de peroxisomas (PPARGC1A o PGC-1 $\alpha$ ), codificado por el gen *Pgc-1 $\alpha$* , identificada como la principal proteína reguladora de la biogénesis mitocondrial. El dominio PR 16 (PRDM16) es una proteína que también se ha identificado en el proceso de marronización con la inducción de las proteínas termorreguladoras UCP-1 y CIDEA.

Diversos estudios han evaluado los efectos de compuestos de alimentos sobre el tejido adiposo. En modelos *in vitro* con células 3T3-L1 se ha demostrado que el ácido *trans*-cinámico, contenido en la corteza de *Cinnamomum cassia* (canela), incrementa la expresión de los genes *Pgc-1 $\alpha$* , *Prdm16* y *Ucp-1*, en concentraciones de 200  $\mu$ M (Kang *et al.*, 2019). También el extracto de *Theobroma cacao* suprime la diferenciación de los adipocitos blancos a través de la regulación negativa de los genes *Ppar $\gamma$*  y *CebpA* (Yamashita *et al.*, 2018).

El té verde, oolong, negro y pu-ehr, derivados de *Camellia sinensis*, también han mostrado en modelos animales con ratas SD (Sprague Dawley) y ratones ICR (Institute of Cancer Research), el incremento de la expresión del gen *Ucp-1* en el TABsc (Yamashita *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2017).

## 2.4 Modelo animal

Durante los siglos XVIII y XIX se desarrollaron ampliamente los modelos animales. Desde entonces, se han utilizado para investigar los principios básicos de la vida, así como para mejorar la comprensión y el tratamiento de las enfermedades humanas. Esto es posible por la implementación de entornos de experimentación controlados que imitan las condiciones fisiológicas y patológicas en organismos modelo (Andersen y Winter, 2019).

La mayoría de los modelos animales de obesidad utilizan roedores (ratas o ratones). El modelo de obesidad inducida por la dieta (OID) imita mejor el estado de obesidad común en humanos, que la mayoría de los modelos genéticamente modificados, y puede ser la mejor opción para evaluar futuros tratamientos (Lutz *et al.*, 2012).

### 2.4.1 Dieta de cafetería

Mientras que las dietas típicas altas en grasas inducen fácilmente el aumento de peso en ratas, existe un modelo más sólido de obesidad inducida por la dieta basado en alimentar a las ratas con una dieta muy apetecible y de alta densidad energética (tocino, galletas, helado, papas fritas), la dieta de “cafetería”. En esta dieta, el 45% de las kilocalorías derivan de grasa y carbohidratos refinados añadidos (Johnson *et al.*, 2016).

El consumo regular de la dieta de cafetería permite el desarrollo de resistencia a la insulina e hiperglucemia. Además, genera hiperfagia que contribuye al desarrollo de obesidad y consecuencias relacionadas a un estado inflamatorio crónico de bajo grado. Se ha visto que este tipo de dieta tiene un efecto a nivel central, en los receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub>, involucrados en la sensación de recompensa, lo que genera adicción y explica el alto consumo de alimentos (Robertson y Rasmussen, 2017).



## 2.5 *Camellia sinensis* y matcha

El té es una bebida aromática que se prepara al infusionar las hojas de la planta *Camellia sinensis*. Después del agua, el té es la bebida más consumida alrededor del mundo. (Kaur y Kaur, 2019). Las dos principales variedades de *C. sinensis* son *Camellia sinensis sinensis* y *Camellia sinensis assamica*. El botánico inglés Robert Sealy determinó que el lugar de origen de la variedad *sinensis* es el distrito de Yunnan en China. La variedad *assamica* es nativa de las zonas cálidas de Tailandia, Laos, Vietnam y sur de China. Hoy en día, *Camellia sinensis* es cultivada en regiones tropicales y subtropicales alrededor del mundo (Shrivastava *et al.*, 2018).

Existen diferentes tipos de té que pueden clasificarse en cuatro clases, de acuerdo con su grado de fermentación: sin fermentar, como el té blanco y el té verde; semifermentado, té oolong; fermentado, té negro, y post-fermentado el té pu-erh. De *C. sinensis sinensis* se producen el té verde, blanco, oolong y negro, mientras que de *C. sinensis assamica* se producen té oolong, negro y pu-erh. Todas estas variedades de té poseen diferentes características organolépticas y nutricionales (Senanayake *et al.*, 2015).

El té verde se produce a partir de las hojas frescas de la planta, que tras su recolección pasan por un proceso de aplicación de vapor y calor. Esto inactiva a la enzima termolábil polifenol oxidasa impidiendo la oxidación de compuestos con actividad biológica, incrementando su cantidad en comparación con otros tipos de té (Saric *et al.*, 2017).

El matcha es un tipo de té verde pulverizado obtenido de la variedad llamada Tencha. Hace siglos era preparado y consumido en los rituales de los budistas Zen en China, después fue llevado a Japón. En la actualidad, el matcha es poco consumido en China, pero en Japón es muy común. La producción de matcha difiere con la del té verde clásico, ya que se elabora a partir de los brotes y hojas jóvenes de *C. sinensis* que han sido parcialmente sombreados por unas cuantas semanas previo a su recolección. Posterior a la aplicación de vapor y secado, las hojas se pulverizan con un molino de piedra. Para su consumo tradicional, el

matcha se prepara agitándolo en agua caliente con un batidor especial hecho de bambú (*chasen*) en un tazón de porcelana (*chawan*) (Topuz *et al.*, 2014).

La planta *C. sinensis* poseen distintos compuestos bioactivos como polifenoles, metilxantinas, clorofila y teanina. Las hojas de Tencha, utilizadas en la producción de matcha, por su particular forma de cultivo presentan mayores cantidades de clorofila y la teanina, que aportan una coloración verde más vibrante y un sabor menos amargo, respectivamente, en comparación con otros tipos de té.

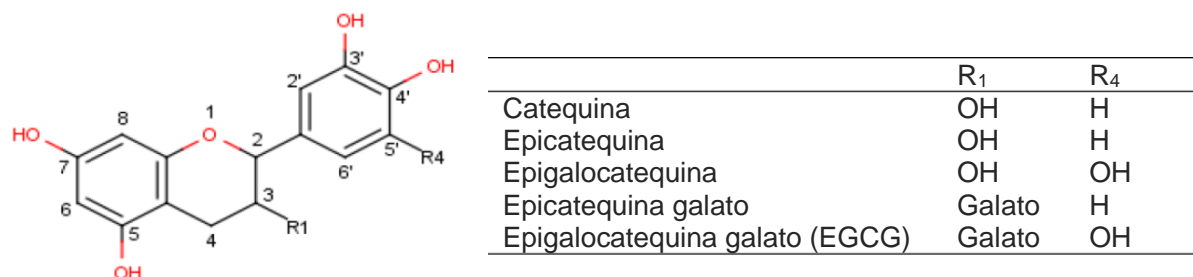
Los compuestos bioactivos más abundantes en el matcha son los polifenoles, cuantificados en un rango de 169-273 mg equivalentes de ácido gálico/g (Kockman *et al.*, 2021). Dentro de los tipos de polifenoles, pueden encontrarse flavanoles, flavandioles y ácidos fenólicos, pero las catequinas son por mucho los compuestos fenólicos predominantes en el matcha y otras variedades de té verde.

Las catequinas llegan a constituir del 5 al 10% del peso seco del matcha, y son más abundantes en las variedades de té verde (5.46-7.44 mg/g) en comparación con el té negro (0-3.47 mg/g) (Adnan *et al.*, 2013). Los principales tipos de catequinas (Figura 5) que muestran actividad biológica son (+)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epigallocatequina, (-)-galocatequina galato, (-)-epicatequina galato y (-)-epigallocatequina galato (EGCG) (Komes *et al.*, 2010; Oz, 2017).

Tales compuestos presentan alta actividad antioxidante debido a su capacidad para neutralizar radicales libres y por incrementar la actividad de enzimas como la glutatión peroxidasa y la catalasa (Kockman *et al.*, 2021). Por tal motivo, las catequinas han mostrado efectos positivos relevantes en la salud como actividad antibacterial, antimutagénica, hipocolesterolémica, antialérgica, entre otros. Asimismo, en algunos estudios clínicos se ha reportado que el matcha puede incrementar la utilización de ácidos grasos como sustrato energético durante el ejercicio (Willems *et al.*, 2020), sugiriéndose que las catequinas son las principales responsables de este efecto.

La EGCG, o epigallocatequina-3-O-galato, es la más numerosa de las catequinas presentes en el matcha, representando hasta el 50% del total. Además,

la EGCG posee la mayor actividad antioxidante entre las catequinas (Fujioka *et al.*, 2016; Phongnarisorn *et al.*, 2018).



**Figura 5.** Estructura de las principales catequinas encontradas en el matcha (Phongnarisorn *et al.*, 2018).

La clorofila es otro compuesto bioactivo que posee actividad antioxidante y antiinflamatoria importante. Las hojas de Tencha poseen mayores cantidades de clorofila que el té verde convencional (5.65 mg/g y 4.33 mg/g, respectivamente) (Kockman *et al.*, 2021).

La teanina es el aminoácido más abundante en las hojas de té verde y en el matcha. Es un análogo del L-glutamato y un aminoácido no proteico. En el matcha el contenido de teanina se ve incrementado debido al sombreado de la planta durante su cultivo, condicionando menor degradación de este aminoácido. En modelos animales y estudios clínicos se ha demostrado que disminuye la ansiedad derivada del estrés psicológico (Unno *et al.*, 2018).

El matcha también contiene metilxantinas como la cafeína y dos dimetilxantinas isoméricas menores, teobromina y teofilina, que son responsables de los efectos levemente estimulantes del té. Además, el matcha es una fuente dietética de polisacáridos no digeribles, vitaminas del complejo B, vitamina C, vitamina E y minerales como potasio, manganeso y zinc (Komes *et al.*, 2010).

El té verde consumido como matcha, asegura la ingesta de todos los compuestos de la hoja, ya que contiene tanto las partes solubles como las insolubles en agua, a diferencia de la infusión convencional de té verde (Xu *et al.*, 2016).

### 3. JUSTIFICACIÓN

El consumo de matcha se ha popularizado en años recientes. En comparación con otros productos derivados de *C. sinensis*, como el té verde o té negro, el consumo de compuestos bioactivos en la bebida de matcha es mayor. Esto se debe a que no se consume una infusión convencional, ya que la hoja completa de la planta va incluida en la bebida. Con ello, además de contener compuestos hidrosolubles, se ingieren también los liposolubles, que suelen estar poco presentes en otro tipo de preparaciones.

Existen investigaciones que sugieren que los polifenoles encontrados en las variedades de té pueden incrementar la utilización de los ácidos grasos como sustrato energético, así como inducir la expresión de genes involucrados en la marronización. Tal proceso incrementa el gasto energético colaborando con la disminución de la masa grasa. Sin embargo, con el matcha, un producto de mayor calidad nutricional, no se han realizado estudios específicos que demuestren que induzca la marronización del tejido adiposo blanco.

Llevar a cabo esta investigación podrá determinar el potencial del consumo de matcha (*C. sinensis*) como una alternativa natural en el tratamiento de la obesidad, que podría ser integrado a la dieta regular de los pacientes junto con otros cambios en el estilo de vida.

#### **4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿El consumo de matcha (*Camellia sinensis*) inducirá el proceso de marronización sobre el tejido adiposo blanco en ratas Wistar macho alimentadas con dieta de cafetería?

#### **5. HIPÓTESIS**

El consumo de matcha (*Camellia sinensis*) induce el proceso de marronización del tejido adiposo blanco en ratas Wistar macho alimentadas con dieta de cafetería.

## 6. OBJETIVOS

### Objetivo general

Evaluar el efecto de la suplementación con matcha (*Camellia sinensis*) sobre la marronización del tejido adiposo blanco en ratas Wistar macho alimentadas con dieta de cafetería

### Objetivos específicos

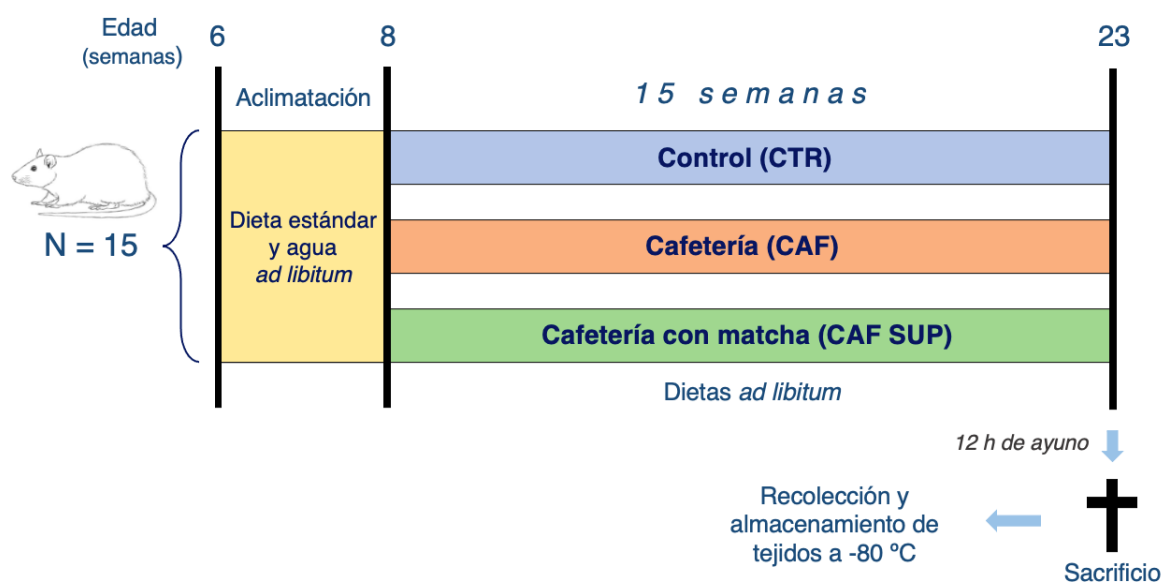
1. Determinar el efecto de la suplementación con matcha (*Camellia sinensis*) sobre el peso, la ingesta y la glucemia en ratas Wistar macho.
2. Analizar el efecto de la suplementación con matcha (*Camellia sinensis*) sobre la expresión de genes relacionados con la marronización del tejido adiposo blanco en ratas Wistar macho, utilizando PCR en tiempo real.

## 7. METODOLOGÍA

### 7.1 Diseño experimental

El presente proyecto corresponde a un estudio experimental aleatorizado. Para el cumplimiento de los objetivos general y específicos se realizó un modelo animal con 15 ratas Wistar macho de 6 semanas de edad, procedentes de Círculo ADN S.A. de C.V. Los animales se aclimataron durante 2 semanas con libre acceso a agua y pienso estándar, temperatura controlada de 21 °C y periodos de luz/oscuridad de 12 horas en el Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS) en la Unidad de Apoyo e Investigación en Modelos Biológicos.

Posterior a la aclimatación, se dividieron de manera aleatoria en tres grupos de 5 ratas cada uno (grupos control, cafetería y cafetería con suplementación). A cada grupo se le administró distinto tipo de dieta *ad libitum* durante 15 semanas (Figura 6). Se registró el peso de las ratas una vez por semana mediante una balanza granataria. La ingesta de alimento se estimó 3 veces por semana, restando la cantidad no consumida por la rata al peso de la dieta proporcionada (50 g/día).



**Figura 6.** Estructura general del diseño experimental.

Previo al sacrificio, las ratas pasaron por un periodo de ayuno de 12 horas y se cuantificó la glucosa por glucometría. Mediante un equipo de disección se recolectaron las muestras de tejido adiposo epididimal, mesentérico, subcutáneo, retroperitoneal y marrón, así como el hígado. Todas las muestras fueron almacenadas en ultracongelación a -80 °C hasta su análisis.

Variable	Tipo	Definición operacional	Unidad y método de medición
Dieta control	Independiente cuantitativa	Dieta regular de las ratas del grupo control, constituida por subproductos de cereales, proteínas de pescado, aceite vegetal, enriquecida con minerales	Gramos Balanza granataria
Dieta de cafetería	Independiente cuantitativa	Dieta obesogénica administrada a las ratas del grupo cafetería, con alta proporción de grasas y azúcares refinados que representa el patrón de dieta occidental	Gramos Balanza granataria
Dieta de cafetería suplementada con matcha	Independiente cuantitativa	Dieta de cafetería que ha sido adicionada con matcha orgánico a una dosis de 100 mg/kg de peso de la rata por día	Gramos Balanza granataria y analítica
Peso corporal	Dependiente cuantitativa	Cantidad total de masa corporal de cada rata	Gramos Balanza granataria
Ingesta	Dependiente cuantitativa	Proporción de la dieta consumida por la rata	Gramos Balanza granataria
Glucemia periférica	Dependiente cuantitativa	Concentración de glucosa libre en sangre periférica	mg/dl Glucómetro
Expresión del gen <i>Actb</i>	Independiente cuantitativa	Expresión del gen que codifica para la $\beta$ -actina, que será usado como referencia para evaluar la expresión de los demás genes	Unidades de expresión relativa RT-qPCR
Expresión relativa del gen <i>Bmp7</i>	Dependiente cuantitativa	Expresión del gen que participa en la diferenciación de preadipocitos a adipocitos beige y marrón	Porcentaje RT-qPCR
Expresión relativa del gen <i>Pgc-1<math>\alpha</math></i>	Dependiente cuantitativa	Expresión del gen involucrado en la biogénesis mitocondrial en tejido adiposo	Porcentaje RT-qPCR



Expresión relativa del gen <i>Prdm16</i>	Dependiente cuantitativa	Expresión del gen que regula la generación de adipocitos beige y marrones	Porcentaje RT-qPCR
--	-----------------------------	---	-----------------------

**Tabla 2.** Operacionalización de variables.

## 7.2 Criterios de selección de la muestra

### 7.2.1 Criterios de inclusión

En este proyecto de investigación se incluyeron animales con las siguientes características:

- Ratas macho del género y especie *Ratus norvegicus*.
- Cepa Wistar
- 6 semanas de edad

### 7.2.2 Criterios de exclusión

- Ratas de distinta cepa o sexo
- Mal estado de salud

### 7.2.3 Criterios de eliminación

- Enfermedad que comprometa la ingesta y estado general del animal
- Muerte del animal
- Muestras insuficientes

## 7.3 Dietas experimentales

Las características energéticas de las dietas que fueron administradas a cada grupo experimental se detallan en la tabla 3.

**Dieta control.** Se utilizó pienso estándar Rodent Lab Chow Diet 5001 de la firma LabDiet.

**Dieta de cafetería.** Se elaboró con galletas maría, papas fritas, pienso, tocino, jarabe de chocolate y paté, en proporción 1:1:1:1:1:2, respectivamente. Los ingredientes fueron molidos con un procesador de alimentos para ser mezclados de forma homogénea.

**Dieta suplementada.** La base para su elaboración fue la dieta de cafetería, con los mismos ingredientes y proporciones. Se añadió matcha orgánico adquirido en HEB S.A. de C.V., calculado a una dosis de 100 mg/kg/día. La dosis se determinó por consenso tras la revisión de distintos artículos que utilizaron extractos de té verde y matcha en modelos murinos, con propósitos diferentes o similares a los de este proyecto. Con esta dosis no se reportó toxicidad en los animales y se obtuvieron resultados estadísticamente significativos (Yamabe *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2017; Unno *et al.*, 2018). Se tomó el peso promedio del grupo semanalmente para actualizar la dosis de matcha

<b>Kcal por cada 100 g</b>	<b>Control</b>	<b>Cafetería</b>	<b>Cafetería suplementada</b>
Totales	335 kcal	372 kcal	372.2 kcal
Carbohidratos	190.95	145.08	145.14
Lípidos	43.55	182.28	182.35
Proteínas	100.5	44.64	44.74
Matcha	-	-	100 mg/kg/día

**Tabla 3.** Contenido energético total y distribución por macronutrientes de las dietas experimentales.

## 7.4 Glucemia periférica

La determinación de la glucosa se realizó mediante el glucómetro Accu-Check Aviva system (Roche Diagnostics). De la porción distal de la cola de la rata se tomó una pequeña muestra de sangre, que se colocó sobre la zona de lectura delimitada en la tira reactiva.

El glucómetro posee un biosensor cuyo principio se basa en la medición de la cantidad de electrones generados por la reacción de sustancias electroactivas con la glucosa de la sangre. Ante la presencia de la coenzima PQQ (pirroloquinolina quinona), la enzima glucosa deshidrogenasa en la tira reactiva, convierte la glucosa de la muestra sanguínea en gluconolactona. La reacción enzimática produce una corriente eléctrica que el glucómetro interpreta a un valor de glicemia.

Materiales y reactivos:

- Accu-Check Aviva system (Roche Diagnostics)
- Tiras reactivas Accu-Check Aviva system (Roche Diagnostics)

## 7.5 Expresión génica

La PCR en tiempo real se utilizó para medir los niveles de expresión de genes seleccionados a nivel del tejido adiposo. La expresión relativa de cada ARNm de interés se calculó en función de un gen de referencia de expresión estable (*housekeeping*), que se determinó para el tipo de tejido y condición experimental.

Se analizó la expresión de los genes *Bmp7*, *Prdm16* y *Pgc-1 $\alpha$*  en el tejido adiposo epididimal y mesentérico (Tabla 4). Tales genes están involucrados en el proceso de marronización del tejido adiposo blanco. Como gen de referencia se empleó el gen *Actb*, que codifica para la proteína  $\beta$ -actina, constituyente del citoesqueleto celular.

### 7.5.1 Aislamiento de ARN

Para el aislamiento de ARN total del tejido adiposo se empleó el RNeasy Mini Kit (Qiagen), el cual está basado en un método de absorción. Esta tecnología combina las propiedades de unión selectiva de una membrana de sílice con la velocidad de microspin. El tampón especializado de alto contenido en sal permite que 100  $\mu$ g de ARN de más de 200 bases se unan a la membrana de sílice del kit.

Gen	Nombre genérico	Cebadores <i>Forward (F)</i> y <i>Reverse (R)</i>
<i>Actb</i>	$\beta$ -actina	F: ACAGGATGCAGAAGGAGATTAC R: ACAGTGAGGCCAGGATAGA
<i>Bmp7</i>	Proteína morfogénica ósea	F: CGCTCCAAGACTCCAAAGAA R: GGTCTCGGAAGCTAACATACAG
<i>Pgc-1<math>\alpha</math></i>	Coactivador 1 $\alpha$ del receptor activado por proliferador de peroxisomas	F: GCCGGAGCAATCTGAGTTAT R: GATCACCAAACAGCCGTAGA
<i>Prdm16</i>	Dominio PR 16	F: GCAGACCCTGTGGGAGTCCTGAAA R: GCTCCCCTGTGTGTGTCCTCAGAT

**Tabla 4.** Secuencia de cebadores que se utilizarán en la PCR en tiempo real (Chen *et al.*, 2017).

El procedimiento para la extracción se llevó a cabo siguiente el protocolo del fabricante, con modificación en la cantidad de muestra, utilizando 150 mg de tejido adiposo en lugar de los 30 mg que indica el kit:

#### **Protocolo de extracción de ARN (RNAeasy Mini Kit)**

1. Añadir 150 mg de tejido adiposo a tubo de microcentrifugación y agregar 600  $\mu$ L de Buffer RLT y una perla metálica.
2. Homogeneizar mediante el equipo *TissueLyser* durante 4 minutos.
3. Sacar la perla con apoyo de una gradilla magnetizada y centrifugar a 20,000 rpm por 3 minutos.
4. Agregar el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrifugado.
5. Añadir 600  $\mu$ L etanol al 70% y transferir 700  $\mu$ L a una columna de centrifugación.
6. Centrifugar por 20 segundos a 8,000 rpm y desechar el líquido del tubo de colección de la columna.
7. Añadir 700  $\mu$ L de Buffer RW1 a la columna de centrifugación y centrifugar por 20 segundos a 8,000 rpm y desechar nuevamente el líquido del tubo de colección.

8. Agregar 500  $\mu$ L de Buffer RPE a la columna y centrifugar por 20 segundos a 8,000 rpm y desechar el líquido del tubo de colección.
9. Añadir nuevamente 500  $\mu$ L de Buffer RPE a la columna y centrifugar por 2 minutos a 8,000 rpm.
10. Pasar la columna de centrifugación a un nuevo tubo de colección y centrifugar por 1 minuto a 20,000 rpm.
11. Colocar la columna de centrifugación en un nuevo tubo de colección (1.5 mL) y añadir 35  $\mu$ L de agua libre de ARNasas directamente en la membrana de sílice de la columna y centrifugar por 1 minuto a 8,000 rpm.
12. Almacenar el tubo de colección con la muestra de ARN total a -80 °C hasta su análisis.

### 7.5.2 Análisis cuantitativo del ARN

La cuantificación del ARN se realizó mediante espectroscopía UV (Sharkey *et al.*, 2004). El método se basa en escalar la absorbancia de la muestra de ARN purificada a longitudes de onda de 260 y 280 nm. La relación  $A_{260}/A_{280} \geq 1.80$  indica una pureza satisfactoria del ARN aislado. Un valor más bajo indica la presencia de contaminantes, tales como proteínas y ADN (Vomelová *et al.*, 2009).

La cantidad y pureza de ARNm aislado se cuantificó utilizando el espectrofotómetro NanoDrop 8000 (Thermo Scientific) a longitudes de onda de 260 y 280 nm. La absorbancia a 260 nm corresponde al pico de absorbancia de los ácidos nucleicos y a 280 nm con el pico de absorbancia de proteínas.

### 7.5.3 Retrotranscripción

Para la producción de ADN complementario (ADNc) a partir del ARN obtenido se llevó a cabo una reacción de retrotranscripción, la cual se realizó mediante el protocolo del kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Este método permite la amplificación de ADNc utilizando como cebadores una mezcla de *random primers* (cebadores de secuencia aleatoria), que amplifican toda la población de ARNs de la muestra. Para la retrotranscripción se utilizó el termociclador GeneAmp PCR System 2400 de Roche y se emplearon los

siguientes reactivos para la preparación de la 2X RT master mix, con los volúmenes necesarios por reacción:

- 10X RT Buffer – 2.0  $\mu$ L
- 25X dNTP Mix (100 mM) – 0.8  $\mu$ L
- 10X RT Random Primers – 2.0  $\mu$ L
- MultiScribe™ Reverse Transcriptase – 1.0  $\mu$ L
- Agua libre de nucleasas – 4.2  $\mu$ L

Para cada reacción se utilizaron 500 ng de ARN total, calculando el volumen de muestra con los resultados de la cuantificación del NanoDrop 8000. La preparación de la reacción se realizó siguiendo el protocolo del kit:

1. Añadir 10  $\mu$ L de 2X RT master mix a un tubo de PCR.
2. Agregar al tubo de PCR el volumen de muestra calculada con 500 ng de ARN total (máximo de 10  $\mu$ L) y homogeneizar 2 veces con la micropipeta.
3. Cerrar el tubo y colocar en minicentrífuga de 5 a 7 segundos.

Inmediatamente, los tubos se colocaron en el termociclador, el cual se programó con las siguientes temperaturas y tiempos:

- 25 °C por 10 minutos (extensión de hexámeros)
- 37 °C por 120 minutos (síntesis de ADNc)
- 85 °C por 5 minutos (inactivación de la transcriptasa reversa)

Posterior a la reacción de retrotranscripción, las muestras generadas de ADNc se almacenaron a -20 °C hasta la realización de la RT-qPCR.

#### **7.5.5 RT-qPCR**

Para la PCR en tiempo real se utilizó el equipo termociclador Light Cycler 480 (Roche), que permite la rápida amplificación del producto y su monitorización

en tiempo real. Para cada reacción de PCR se añadieron los siguientes reactivos y volúmenes en microtubos:

- TaqMan Gene Expression Master Mix – 5  $\mu$ L
- TaqMan Gene Expression Assay – 0.5  $\mu$ L
- ADNc de cada muestra – 1  $\mu$ L
- Agua libre de nucleasas – 3.5  $\mu$ L

Tras homogeneizar el contenido de los microtubos se procedió a colocar la mezcla de reacción en una placa de PCR de 96 pocillos (10  $\mu$ L de mezcla por pocillo). La placa se incubó en el termociclador con el siguiente protocolo:

- 50 °C por 2 minutos (incubación de la uracilo ADN glicosilasa -UDG-)
- 95 °C por 10 minutos (inactivación de la UDG y activación de la ADN polimerasa)
- 50 ciclos de:
  - 95 °C por 15 segundos (desnaturalización)
  - 60 °C por 1 minuto (hibridación)

Las reacciones de amplificación se realizaron por triplicado para cada una de las muestras y con todos los genes. También se emplearon pocillos sin muestra de ADNc, siendo los controles negativos que aseguraron la ausencia de contaminación.

La expresión relativa de los genes seleccionados se calculó con base en el valor del ciclo umbral (Ct) registrado en el Light Cycler 480 Software (Roche).

## 8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados están presentados como la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM). En el análisis estadístico se empleó el programa SPSS versión 25.0 y para estudiar las diferencias entre grupos de experimentación se utilizaron los métodos ANOVA de 1 factor con prueba post hoc de Tukey y Kruskal-Wallis. Se realizó la prueba  $t$  de Student para comparaciones simples entre los grupos CTR y CAF. Se consideró un valor  $p < 0.05$  como estadísticamente significativo.



## **9. RECURSOS**

El proyecto se desarrolló en la Unidad de Modelos Biológicos y en la Unidad de Genómica del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS). En dichas áreas se contó con los equipos, materiales y reactivos necesarios para el cumplimiento de los objetivos específicos.

### **9.1 Financieros**

Este proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y por el Programa para el Desarrollo Profesional Docente (PRODEP).

### **9.2 Humanos**

Durante el desarrollo del proyecto se contó con la participación de investigadores, técnicos de laboratorio y asistentes de la Unidad de Investigación en Nutrición, así como de la Unidad de Genómica del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS).

## 10. CONSIDERACIONES ÉTICAS Y DE BIOSEGURIDAD

Este proyecto de investigación cumplió con las disposiciones y lineamientos de trabajo en laboratorio sentados por el Comité Institucional de Bioseguridad del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS) y por el Comité de Bioética en Investigación en Ciencias de la Salud (COBICIS) de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Los comités se apegan a lo establecido en tres normas mexicanas:

- NOM-062-ZOO-1999 Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Comprende las disposiciones generales sobre identificación, tipo de jaulas, manejo del animal, alimento, y demás.
- Ley Federal de Sanidad Animal (Reforma 07-06-2012). Especifica las medidas zoonosanitarias para proteger la salud y bienestar de los animales.
- Ley de protección y bienestar animal para la sustentabilidad del estado de Nuevo León. Referente a la atención de los animales por un Médico Veterinario Zootecnista para asegurar su bienestar y sobre métodos de sacrificio o eutanasia, principalmente.

El principio de las Tres Erres en la experimentación animal “Reemplazar, Reducir y Refinar” se aplicó para la disminución del sufrimiento y estrés de los animales.

Para ingresar y trabajar en el bioterio se utilizaron bata, guantes, cubrezapatos y cubrebocas. De igual manera, en el laboratorio se empleó bata, guantes y lentes protectores durante el desarrollo. Todo objeto punzocortante tras su uso se almacenó en un contenedor rojo para punzocortantes. Los residuos no anatómicos, como sangre se dispusieron en bolsas rojas.

Los residuos biológicos fueron desechados en bolsas RPBI (Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos) que posteriormente se congelaron y incineraron, de acuerdo con la NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

## 11. RESULTADOS

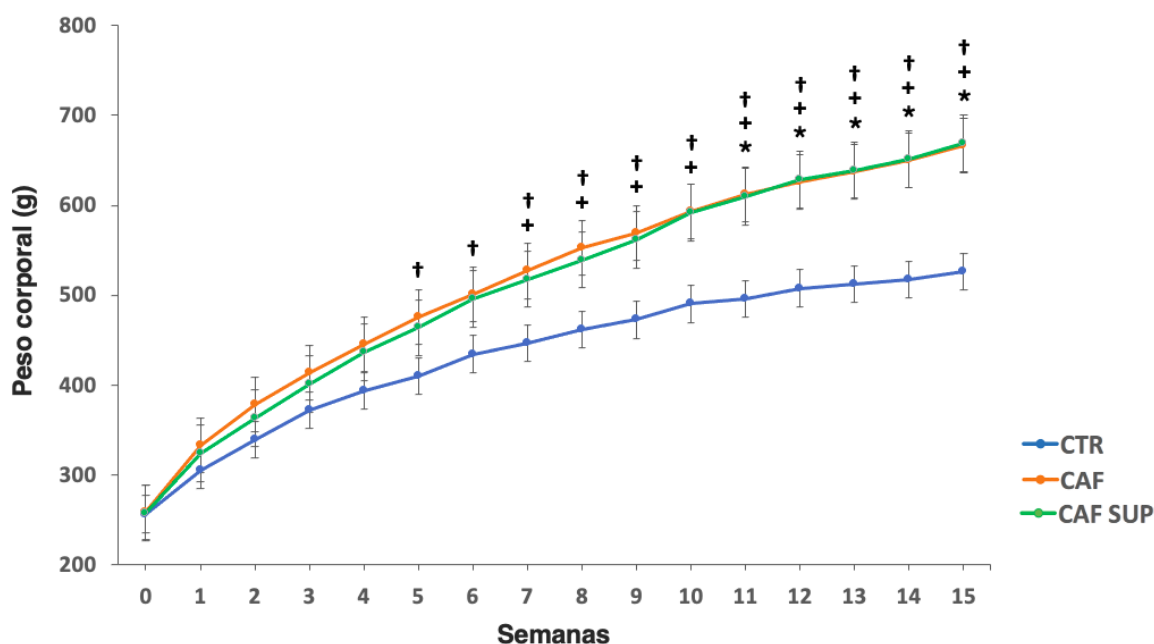
### 11.1 Objetivo específico 1

Efecto de la suplementación con matcha (*Camellia sinensis*) sobre el peso, la ingesta y la glucemia en ratas Wistar macho.

#### 11.1.1 Peso corporal e ingesta de alimento

Para evaluar el efecto de la suplementación con matcha sobre el peso de las ratas, se registró dicho parámetro una vez por semana. En la figura 7 se muestran los pesos corporales promedio de cada grupo durante 15 semanas. El bioensayo inició con pesos promedio sin diferencia estadística en los tres grupos (semana 0).

A partir de la semana 7, mediante la prueba Kruskal-Wallis, se encontró diferencia estadística entre los pesos de los grupos CTR y CAF ( $446.90 \pm 8.56$  g y

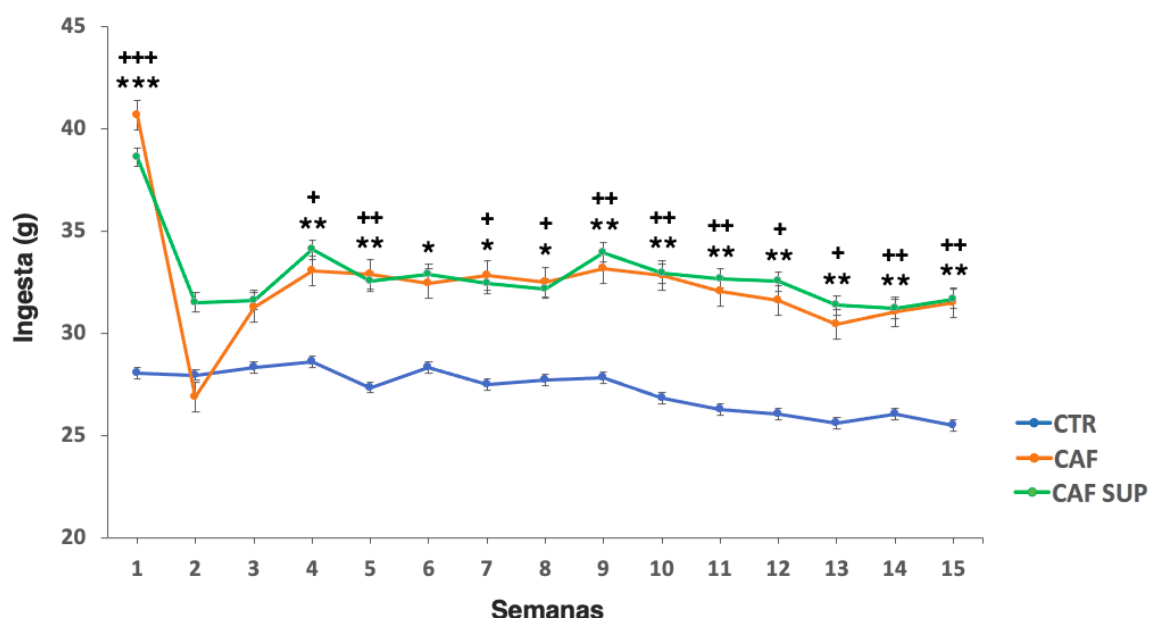


**Figura 7.** Evolución del peso corporal durante 15 semanas. CTR, grupo control; CAF, grupo cafetería; CAF SUP, grupo cafetería suplementada. Los datos son la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM). Se realizó la prueba Kruskal-Wallis para analizar las diferencias de la media entre grupos ( $n = 5$  ratas/grupo). +  $p < 0.05$  (CTR vs. CAF); \*  $p < 0.05$  (CTR vs. CAF SUP). † prueba  $t$  de Student  $p < 0.05$  (CTR vs. CAF).

526.98  $\pm$  29.22 g, respectivamente). Entre los grupos CTR y CAF SUP los pesos mostraron diferencia significativa a partir de la semana 11 (495.60  $\pm$  10.89 g y 609  $\pm$  35.09 g, respectivamente). Los pesos de los grupos CAF Y CAF SUP no presentaron diferencia estadística durante todo el bioensayo. En la semana 15 el peso corporal del grupo CAF SUP (668.74  $\pm$  43.80 g) fue ligeramente superior al grupo CAF (666.80  $\pm$  35.68 g), pero no fue estadísticamente significativo.

Para analizar el efecto de la dieta de cafetería en el peso, se realizaron comparaciones simples entre los grupos CTR y CAF mediante la prueba *t* de Student, obteniendo significancia estadística desde la semana 5 hasta el final del bioensayo.

En la figura 8 se muestra la ingesta de alimento promedio por rata durante 15 semanas. A excepción de las semanas 2 y 3 del bioensayo, la ingesta de los grupos CAF y CAF SUP fue superior al control. Entre los grupos con dieta de cafetería la ingesta no tuvo diferencia estadística.



**Figura 8.** Ingesta de alimento durante 15 semanas. CTR, grupo control; CAF, grupo cafetería; CAF SUP, grupo cafetería suplementada. Los datos son la media  $\pm$  EEM. Se realizó la prueba ANOVA de un factor con prueba post hoc de Tukey ( $n = 5$  ratas/grupo). +  $p < 0.05$ , ++  $p < 0.01$ , +++  $p < 0.001$  (CTR vs. CAF); \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  (CTR vs. CAF SUP).

La dosis de matcha adicionada a la dieta de cafetería fue de 100 mg/kg/día. Sin embargo, las ratas del grupo CAF SUP no consumían en su totalidad la dieta proporcionada (al igual que los otros grupos), por ello se realizó un cálculo y la dosis consumida fue de  $65.79 \pm 3.44$  mg/kg/día.

En la tabla 5 se muestran distintas variables relacionadas con el peso y la ingesta de alimento, donde la ganancia de peso, la ingesta total de alimento, la ingesta diaria de alimento y la ingesta total de calorías fueron superiores en los grupos CAF y CAF SUP que en el grupo CTR.

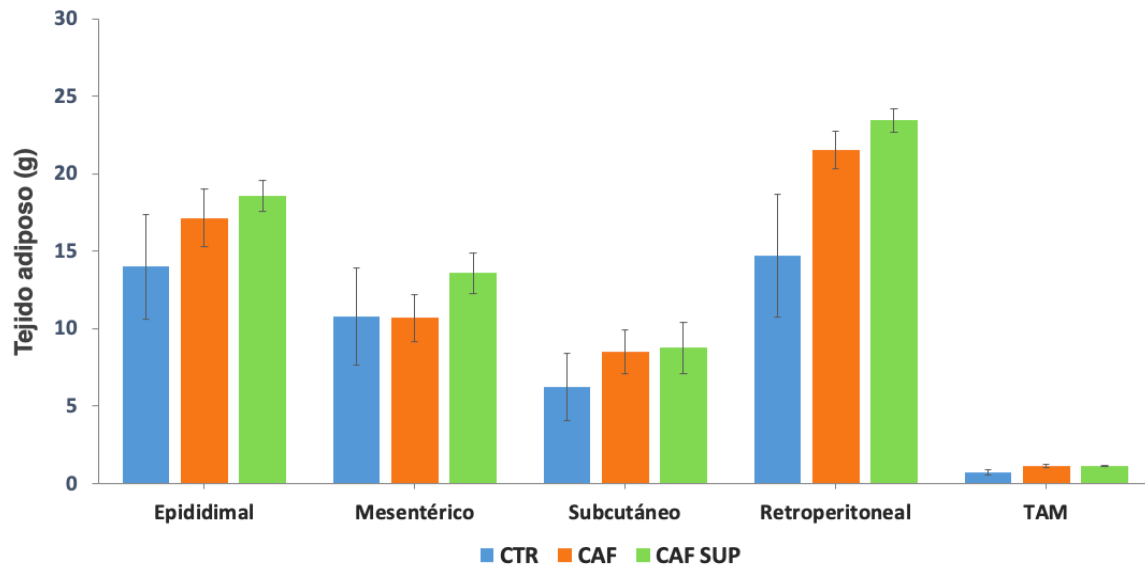
Variable	CTR	CAF	CAF SUP
Peso inicial (g)	$259.47 \pm 8.26^a$	$260.42 \pm 7.92^a$	$257.15 \pm 3.34^a$
Ganancia de peso (g)	$269.98 \pm 6.70^b$	$408.32 \pm 29.39^a$	$411.02 \pm 46.86^a$
Ingesta total de alimento (g)	$2854.87 \pm 44.24^a$	$3394.63 \pm 128.15^b$	$3443.63 \pm 119.11^b$
Ingesta diaria de alimento (g)	$27.19 \pm 0.42^b$	$32.33 \pm 1.22^a$	$32.79 \pm 1.13^a$
Ingesta total de calorías (kcal)	$9563.81 \pm 148.21^a$	$12628.04 \pm 476.71^b$	$12810.31 \pm 443.11^b$
Eficiencia energética (g/100 kcal)	$2.82 \pm 0.03^b$	$3.21 \pm 0.12^b$	$3.17 \pm 0.27^b$

**Tabla 5.** Efectos de las dietas experimentales sobre variable de peso, ingesta y eficiencia energética. CTR, grupo control; CAF, grupo cafetería; CAF SUP, grupo cafetería suplementada. Los datos son la media  $\pm$  EEM. Letras distintas por fila (a, b) indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) mediante ANOVA de un factor con prueba post hoc de Tukey ( $n = 5$  ratas/grupo).

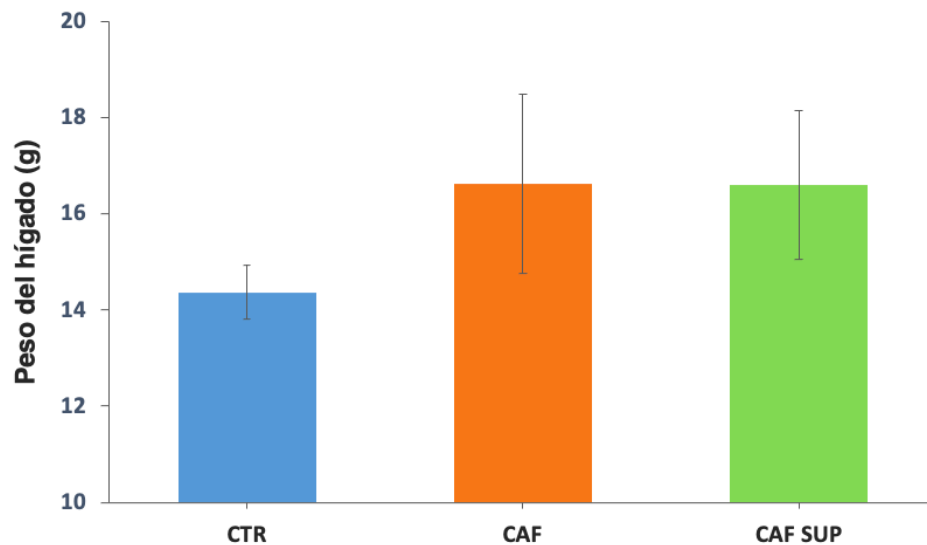
### 11.1.2 Pesos de tejidos

Los pesos de los distintos tejidos adiposos recolectados se muestran en la figura 9. Con excepción del tejido adiposo mesentérico, en el resto de los tejidos se observa mayor peso en los grupos con dieta de cafetería. No obstante, no se encontró diferencia significativa entre los tres grupos.

Respecto al peso del hígado (Figura 10), los grupos CAF y CAF SUP poseen mayor peso que el grupo control ( $16.62 \pm 1.87$  y  $16.60 \pm 1.54$  g, respectivamente), sin diferencia estadística entre grupos.



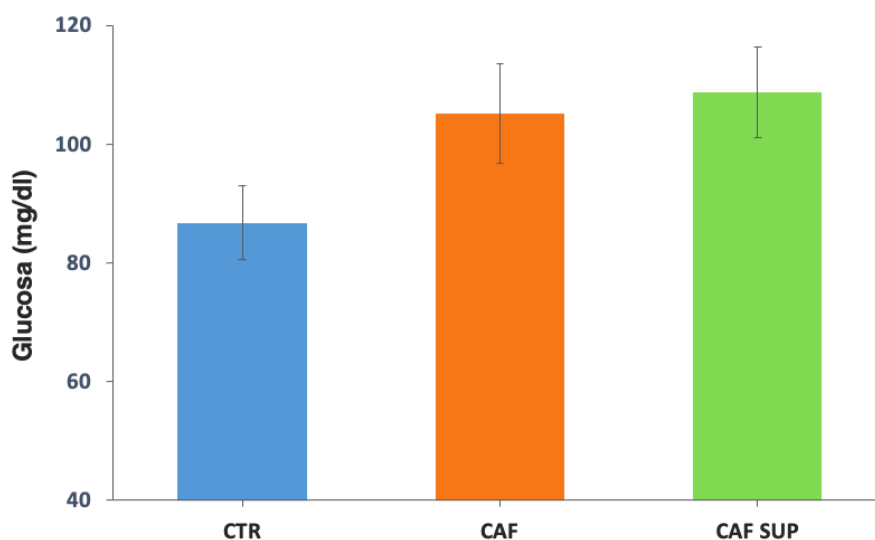
**Figura 9.** Pesos de los tejidos adiposos. CTR, grupo control; CAF, grupo cafetería; CAF SUP, grupo cafetería suplementada; TAM, tejido adiposo marrón. Los datos son la media  $\pm$  el error estándar de la media ( $n = 5$  ratas/grupo). Análisis estadístico realizado con ANOVA de un factor con pruebas post hoc de Tukey.



**Figura 10.** Peso del hígado. CTR, grupo control; CAF, grupo cafetería; CAF SUP, grupo cafetería suplementada. Los datos son la media  $\pm$  SEM. Se realizó ANOVA de un factor para analizar las diferencias de la media entre grupos ( $n = 5$  ratas/grupo).

### 11.1.3 Glucosa

La glucemia periférica se midió tras 12 horas de ayuno mediante glucometría capilar. En la figura 11 se muestran los resultados donde los grupos CAF y CAF SUP tuvieron valores más altos ( $105.2 \pm 8.35$  y  $108.8 \pm 7.69$  mg/dl, respectivamente) que el grupo control ( $86.8 \pm 6.25$  mg/dl), pero no se obtuvo diferencia estadística.



**Figura 11.** Glucemia periférica en ayuno. CTR, grupo control; CAF, grupo cafetería; CAF SUP, grupo cafetería suplementada. Los datos son la media  $\pm$  SEM. Se realizó ANOVA de un factor para analizar las diferencias de la media entre grupos ( $n = 5$  ratas/grupo).

## 11.2 Objetivo específico 2

**Efecto de la suplementación con matcha (*Camellia sinensis*) sobre la expresión de genes relacionados con la marronización del tejido adiposo blanco en ratas Wistar macho**

Los genes involucrados en distintas vías del proceso de marronización se analizaron mediante RT-qPCR. Se tomaron muestras de los tejidos adiposos epididimal y mesentérico. Estos tejidos se eligieron con base en la mayor presencia de marronización de acuerdo a la bibliografía.

El método delta-delta Ct ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) fue utilizado para calcular la expresión génica relativa. La cuantificación relativa en la expresión de cada gen de estudio se normalizó con respecto a un gen de referencia (*Actb*), llevando los grupos control a un valor de 1.

### 11.2.1 Tejido adiposo epididimal

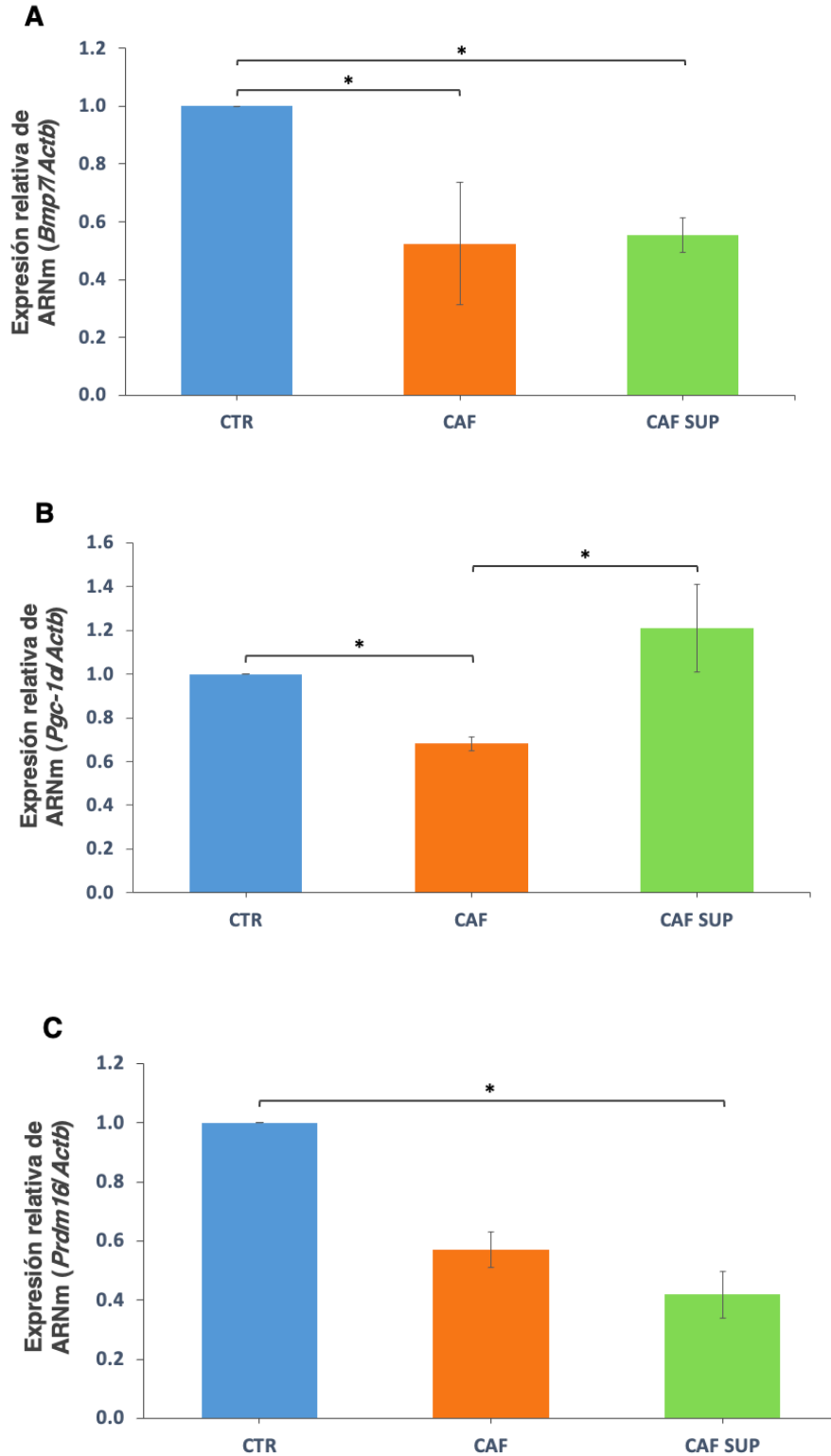
La expresión relativa del gen *Bmp7* (Figura 12 A), uno de los inductores de la marronización, fue menor en los grupos con dieta de cafetería ( $p < 0.05$ ). El gen *Pgc-1 $\alpha$*  (Figura 12 B), que participa en la biogénesis mitocondrial, tuvo mayor expresión en el grupo CAF SUP. Por otra parte, el gen *Prdm16* (Figura 12 C), regulador de las vías de marronización, presentó expresión más baja en los grupos CAF y CAF SUP, siendo significativamente menor en el grupo con suplementación de matcha.

### 11.2.2 Tejido adiposo mesentérico

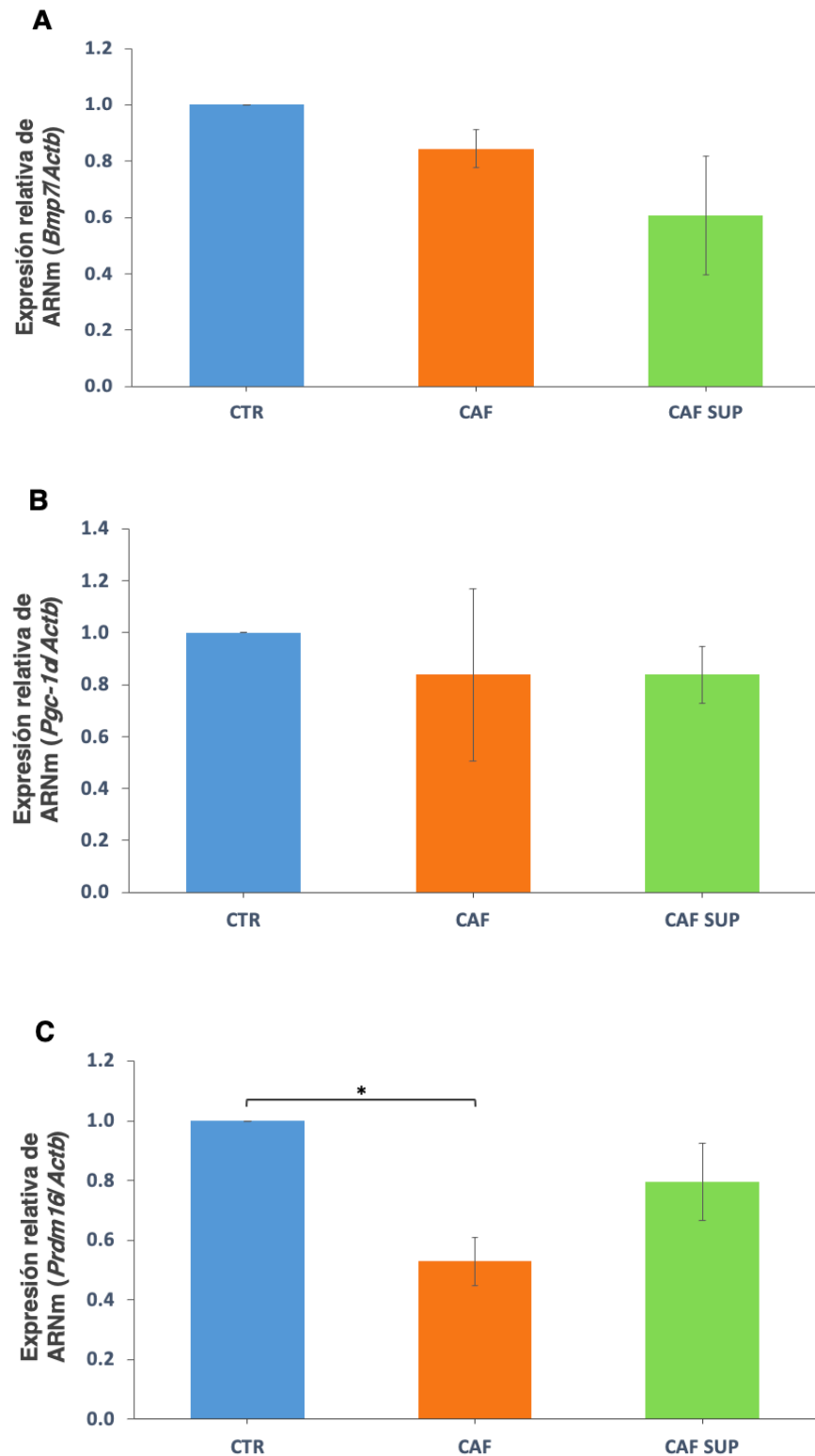
Con los genes *Bmp7* y *Pgc-1 $\alpha$*  (Figura 13 A, B) la expresión fue menor en los grupos CAF y CAF SUP, pero no se obtuvo significancia estadística ( $p > 0.05$ ). El gen *Prdm16* (Figura 13 C) tuvo expresión significativamente menor en el grupo CAF con respecto al grupo CTR.

En la tabla 6 se muestran los valores del umbral de ciclos (Ct -cycle threshold-), de los genes en cada grupo obtenidos en la RT-qPCR. Dichos valores fueron utilizados para el cálculo de la expresión relativa en relación al gen constitutivo *Actb*. Para cada gen y en ambos tejidos adiposos, no se encontraron diferencias estadísticas entre grupos.





**Figura 12.** Expresión de los genes *Bmp7* (A), *Pgc-1α* (B) y *Prdm16* (C) en tejido adiposo epididimal. CTR, grupo control; CAF, grupo cafetería; CAF SUP, grupo cafetería suplementada. Datos reportados como la media  $\pm$  EEM. Se realizó la prueba Kruskal-Wallis para analizar las diferencias entre grupos (n = 5 ratas/grupo). \*  $p < 0.05$ .



**Figura 13.** Expresión de los genes *Bmp7* (A), *Pgc-1α* (B) y *Prdm16* (C) en tejido adiposo mesentérico. CTR, grupo control; CAF, grupo cafetería; CAF SUP, grupo cafetería suplementada. Datos reportados como la media  $\pm$  EEM. Se realizó la prueba Kruskal-Wallis para analizar las diferencias entre grupos (CTR y CAF SUP:  $n = 4$  ratas/grupo, CAF:  $n = 3$  ratas/grupo). \*  $p < 0.05$ .

Gen	CTR	CAF	CAF SUP
<b>Tejido adiposo epididimal</b>			
<i>Actb</i>	18.51 ± 0.42	17.72 ± 0.33	17.78 ± 0.25
<i>Bmp7</i>	27.12 ± 0.63	27.53 ± 0.44	27.73 ± 0.76
<i>Pgc-1<math>\alpha</math></i>	32.22 ± 0.48	32.20 ± 0.28	31.56 ± 0.21
<i>Prdm16</i>	27.50 ± 0.20	27.07 ± 0.21	27.72 ± 0.40
<b>Tejido adiposo mesentérico</b>			
<i>Actb</i>	20.07 ± 0.27	19.52 ± 0.21	19.57 ± 0.06
<i>Bmp7</i>	27.43 ± 0.38	27.13 ± 0.32	28.04 ± 0.70
<i>Pgc-1<math>\alpha</math></i>	32.45 ± 0.22	32.38 ± 0.75	32.25 ± 0.21
<i>Prdm16</i>	27.49 ± 0.27	27.90 ± 0.44	27.38 ± 0.57

**Tabla 6.** Valores del umbral de ciclos (Ct) los genes *Actb*, *Bmp7*, *Pgc-1 $\alpha$*  y *Prdm16* en tejido adiposo epididimal y mesentérico. CTR, grupo control; CAF, grupo cafetería; CAF SUP, grupo cafetería suplementada. Datos reportados como la media ± EEM. Se realizó la prueba Kruskal-Wallis sin diferencias entre grupos.

## 12. DISCUSIÓN

La obesidad incrementa la incidencia y prevalencia de enfermedades crónicas degenerativas, tales como la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y enfermedades cardiovasculares. Dado el continuo aumento de la obesidad en la población a nivel mundial, se ha buscado el desarrollo de mejores estrategias y nuevas alternativas para prevenir o aminorar sus repercusiones (Gadde *et al.*, 2018).

Para comprender mejor la patogenia y fisiopatología de la obesidad se han desarrollado distintos modelos de obesidad inducida por la dieta en estudios animales (Lutz *et al.*, 2012). Las dietas comerciales altas en grasa y en energía han sido ampliamente utilizadas en modelos animales los últimos años. Sin embargo, no suelen ser lo suficientemente representativas de los patrones alimenticios occidentales en humanos (Johnson *et al.*, 2016).

La dieta de cafetería asemeja en mayor medida al patrón de dieta occidental, caracterizado por un mayor consumo de alimentos ultraprocesados que poseen alta densidad energética, hidratos de carbono refinados, grasa saturadas y varios aditivos (Robertson y Rasmussen, 2017). Por ello, este tipo de dieta fue seleccionado para nuestro estudio.

### 12.1 Objetivo específico 1

**Efecto de la suplementación con matcha (*Camellia sinensis*) sobre el peso, la ingesta y la glucemia en ratas Wistar macho.**

En este objetivo específico se planteó determinar si la administración de matcha junto con la dieta de cafetería (grupo CAF SUP) produciría algún cambio benéfico en el peso corporal, la ingesta de alimento y la glucemia periférica en ayuno; en comparación con ratas control y un grupo que solo recibió dieta de cafetería (grupo CAF).

### 12.1.1 Peso corporal e ingesta de alimento

Respecto al peso corporal, los grupos que recibieron dieta de cafetería (CAF y CAF SUP) tuvieron un mayor incremento de peso en comparación con el grupo CTR que consumió dieta estándar. Este resultado era el esperado debido a la mayor densidad calórica de la dieta cafetería, los efectos metabólicos por su composición y la hiperfagia inducida (Robertson y Rasmussen, 2017).

Un aspecto notable en las ratas del grupo CAF, fue que su peso comenzó a ser significativamente mayor al del grupo CTR en la semana 7 del bioensayo. En cambio, las ratas del grupo CAF SUP tuvieron peso significativamente mayor hasta la semana 11. Este resultado podría atribuirse a la suplementación con matcha, ya que es el único factor que fue distinto entre ambos grupos, generando una mayor resistencia frente a la ganancia de peso, al menos desde la semana 1 a la 10 del estudio.

En el estudio de Akmal *et al.* (2020), encontraron que la menor ganancia de peso en modelos animales con dietas obesogénicas puede adjudicarse a la presencia de compuestos bioactivos, como los polifenoles, que participan en la activación de rutas metabólicas de lipólisis.

En nuestro bioensayo se constató que la dieta de cafetería induce hiperfagia, con mayores ingestas en los grupos CAF y CAF SUP. Contrario a los resultados en el peso, las ratas del grupo CAF SUP tuvieron una mayor tendencia de consumo de dieta durante el bioensayo, infiriendo que la suplementación con matcha no tuvo impacto positivo en esta variable.

En algunos estudios se ha evaluado el efecto del té verde y del matcha sobre las variables de peso corporal e ingesta de alimento. Las metodologías de los estudios presentan variaciones en los tipos de dieta utilizada, duración, tipo de suplementación y dosis.

En el estudio de Zhou *et al.* (2020), realizaron un modelo animal de obesidad inducida por la dieta con ratones C57BL/6 y suplementación con matcha. Los animales fueron divididos en 5 grupos, alimentados con distintas dietas durante 6 semanas: dieta estándar (10% grasa), dieta alta de grasa (DAG -60% grasa-) y tres

grupos con DAG mezclados con matcha a distintas concentraciones (0.1, 0.5 y 1%). Se registraron los pesos de los ratones e ingesta de alimento una vez por semana.

Los ratones con DAG suplementada con matcha mostraron menor ganancia de peso, pero solo el grupo con 1% de matcha tuvo significancia estadística respecto al grupo de DAG, indicando un posible efecto benéfico en esta variable a medida que la dosis se incrementa. En la ingesta, la administración de matcha no produjo cambios significativos, pero los grupos con matcha mostraron una ligera tendencia de mayor consumo de alimento (ingesta de alimento en grupos con matcha g/día: matcha 0.1%:  $6.99 \pm 1.25$ , matcha 0.5%:  $7.02 \pm 1.02$ , matcha 1%:  $6.80 \pm 1.22$ , DAG  $6.61 \pm 0.71$ .).

Al comparar este estudio con nuestra investigación, la principal diferencia es el tipo de dieta empleada. Aunque en nuestro estudio se utilizó una concentración similar de matcha similar a la más baja (0.097%), la variación de los resultados puede deberse a que la dieta de cafetería induce una mayor ganancia de peso e hiperfagia que las dietas comerciales altas en grasa y energía (Sampey *et al.*, 2011 y Leigh *et al.*, 2019), es decir, la dieta de cafetería induce un fenotipo con mayores alteraciones patológicas que el generado por la DAG, siendo más difícil de revertir.

Xu *et al.* (2016), emplearon ratones ICR macho, DAG y suplementación con matcha en concentraciones de 0.025%, 0.05% y 0.075%. La duración del estudio fue de 4 semanas y el peso se registró cada dos días. Los grupos con DAG que recibieron 0.025% y 0.05% de matcha tuvieron pesos significativamente menores. Incluso, con la concentración de 0.05% el peso fue similar al grupo control con dieta estándar.

De igual manera, aunque la dosis de este estudio fue similar a la empleada en nuestra investigación, existe la discrepancia en el tipo de dieta empleada. Además, el tiempo de duración del estudio también puede generar diferencias en los resultados. Nuestro estudio tuvo una duración de 15 semanas, más del doble que los de Zhou y Xu. Un mayor tiempo de exposición a dietas obesogénicas puede estar ligado con mayores repercusiones o cambios en las variables de estudio. Incluso, cabe recalcar que en las primeras 11 semanas de nuestro bioensayo, el

grupo CAF SUP, aunque no fue estadísticamente significativo, mostró menores pesos que el grupo CAF ( $10.20 \pm 2.26$  g menos de peso en el grupo CAF SUP).

Los autores Yamabe *et al.* (2009), emplearon ratas macho cepas OLEFT (*Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty*) y LETO (*Long-Evans Tokushima Otsuka*). Las ratas OLEFT están genéticamente modificadas para que desarrollen obesidad leve y DM2 en su edad adulta. Todas las ratas recibieron una dieta estándar. Las ratas OLEFT se dividieron en 4 grupos, a tres de ellos se les administró matcha por sonda oral 50, 100 y 200 mg/kg de peso corporal/día, durante 16 semanas. El cuarto grupo fue el control y recibió agua por sonda en lugar de matcha. Las ratas LETO son tipo silvestre y formaron otro grupo control.

En las ratas OLEFT suplementadas con matcha, el peso mostró una tendencia a la baja dosis-dependiente desde la semana 8, pero no fue estadísticamente significativo. La ingesta de las ratas que recibieron matcha fue significativamente mayor a partir de la semana 12, con respecto a los controles.

En este caso se emplearon cepas modificadas en lugar de un modelo de obesidad inducida por la dieta (OID). Se ha reportado que los modelos de OID son más fiables para la evaluación de la obesidad y sus complicaciones que los modelos genéticamente modificados, por la semejanza en los factores etiológicos ambientales (Lutz *et al.*, 2012).

Particularmente en el estudio de Yamabe *et al.* (2009), llama la atención que al igual que en nuestro bioensayo, los grupos suplementados con matcha tuvieron mayor ingesta de alimento, sin embargo, sus pesos fueron menores que los grupos sin suplementación. Aunque no exista significancia estadística en los pesos, tanto en nuestro estudio como el de Yamabe, podría existir un incremento del gasto energético condicionado por el matcha.

Hay dos investigaciones que reportan la utilización de dieta de cafetería con suplementación de té verde. En el estudio de Bucco *et al.* (2017), a distintos grupos de ratones suizos hembra se les administró dieta estándar, dieta de cafetería y dieta de cafetería más infusión de té verde (1 g de hojas/100 mL de agua) durante 8 semanas. La ganancia de peso fue ligeramente mayor en el grupo con té verde

( $12.6 \pm 5.21$  g), pero sin significancia estadística respecto al grupo con dieta de cafetería ( $11.78 \pm 4.17$  g).

Los resultados del modelo de Bucco concuerdan con nuestro estudio, donde, al final del ensayo, la suplementación no tiene un impacto favorable en el peso corporal. Sin embargo, el tipo de suplementación es distinto, ya que el autor Bucco empleó infusión de té verde, limitando la ingesta de compuestos bioactivos que son insolubles en agua.

En el estudio de Bolin *et al.* (2020), ratones C57BL/6 macho fueron divididos en tres grupos y alimentados con dieta estándar, dieta de cafetería y dieta de cafetería más 500 mg/kg de té verde durante 12 semanas. Al término, el grupo que recibió dieta de cafetería más té verde tuvo significativamente menor peso que el grupo con solo dieta de cafetería.

De las investigaciones revisadas, el estudio de Bolin es el que emplea la mayor dosis de té verde, obteniendo resultados favorables frente a la dieta de cafetería. Si bien el tipo de suplementación difiere con nuestro bioensayo, la dosis empleada es mucho mayor. Aunque nuestra dosis de matcha es comparable con la de estudios previamente citados, al enfrentarse a una dieta que genera mayores impactos metabólicos negativos que las dietas comerciales (DAG y DAE), la dosis puede ser insuficiente para disminuir la ganancia de peso.

### **12.1.2 Pesos de tejidos**

En el estudio de Chen *et al.* (2017), realizado con ratas Sprague Dawley, a un grupo se le administró dieta alta en energía (DAE), y a otros dos grupos se les alimentó con DAE más extracto de té verde en dosis de 77.5 y 155 mg/kg/día. El estudio tuvo una duración de 8 semanas y al finalizar se reportó menor peso en los tejidos adiposos epididimal y mesentérico de los grupos con extracto de té verde, con una reducción de hasta el 2% en la grasa corporal. Este resultado es favorable porque implica la movilización de lípidos para su uso como sustrato energético en lugar de su deposición.

En nuestra investigación los tejidos adiposos del grupo CAF SUP no presentaron disminución en su peso. Las diferencias en nuestros resultados con el



estudio de Chen pueden explicarse por el tipo de dieta empleada, ya que la dieta de cafetería induce también un mayor depósito de tejido adiposo que la DAG (Sampey *et al.*, 2011).

Por otro lado, Attademo *et al.* (2017), emplearon un modelo animal con ratas Wistar hembra, que fueron divididas en grupo control y grupo de té verde, donde sustituyeron el agua por infusión de té verde (10 g de hojas/l de agua). Ambos grupos recibieron dieta estándar. Tras 18 semanas, el peso no mostró diferencia significativa entre grupos. Sin embargo, al determinar la grasa visceral mediante tomografía computarizada, se reportó menor área en el grupo de té verde ( $3.67 \pm 1.2 \text{ cm}^2$ ) que en el grupo control ( $6.25 \pm 2.2 \text{ cm}^2$ ).

Además, se demostró que el té verde puede disminuir el depósito de grasa a nivel visceral aún cuando los animales reciben una dieta saludable. En nuestro bioensayo no se contó con un grupo control suplementado con matcha, pero esta investigación puede darnos un panorama de los efectos del té verde bajo un factor dietético más favorable.

Con Yamabe *et al.* (2009), el peso del hígado fue 7.5% y 8.6% menor en las ratas OLEFT que recibieron 100 y 200 mg/kg/día de matcha, respectivamente. En la dosis de 50 mg/kg/día también fue menor pero sin significancia estadística. Contrario a nuestros resultados, en este modelo con cepas modificadas, el matcha está condicionando una menor deposición lipídica a nivel hepático.

### **12.1.3 Glucosa**

En nuestro estudio, aunque no se obtuvo significancia estadística, la glucemia capilar fue mayor en los grupos con dieta de cafetería. El resultado también era esperado porque, independientemente del tipo de dieta obesogénica empleada, se generan alteraciones en la homeostasis metabólica. Sin embargo, en el grupo CAF SUP existe variación de nuestros resultados con la bibliografía revisada.

En el estudio de Zhou *et al.* (2020), los niveles séricos de glucosa en el grupo con DAG fueron de  $9.78 \pm 0.46 \text{ mmol/l}$ , mientras que en los grupos con suplementación de matcha al 0.1%, 0.5% y 1% fueron de  $8.20 \pm 0.25$ ,  $8.13 \pm 0.20$

y  $7.70 \pm 0.12$  mmol/l, respectivamente; con disminución de hasta 21.3% de la glucemia en el grupo con 1% de matcha. Con Xu *et al.* (2016), los niveles de glucosa disminuyeron 13.3%, 21.2% y 23.6% en los grupos con matcha a 0.025%, 0.05% y 0.075%, respectivamente. En el estudio de Yamabe *et al.* (2009), la glucosa sérica tuvo disminución significativa a las 16 semanas para las dosis de matcha de 100 y 200 mg/kg/día.

En los tres estudios anteriores, los niveles de glucosa fueron menores en los grupos suplementados con matcha, sin embargo, emplearon DAG o cepas modificadas. En este contexto, se debe tomar en cuenta que la dieta de cafetería induce mayor alteración metabólica que las dietas obesogénicas comerciales (Sampey *et al.*, 2011 y Leigh *et al.*, 2019), y los modelos de obesidad inducida por la dieta son más representativos que los modelos genéticamente modificados (Lutz *et al.*, 2012). Por lo tanto, las diferencias de nuestros resultados con los de otros autores pueden explicarse, en parte, por el modelo obesogénico empleado.

## **12.2 Objetivo específico 2**

### **Expresión de genes relacionados con la marronización del tejido adiposo blanco**

En el proceso de marronización se han identificado vías y mecanismos que conducen a la formación de adipocitos beige. Los genes *Bmp7*, *Pgc-1 $\alpha$*  y *Prdm16*, seleccionados en nuestra investigación, codifican proteínas que participan en distintos niveles de las vías de marronización. De los tres genes analizados, solo el gen *Pgc-1 $\alpha$*  mostró inducción en el tejido adiposo epididimal de las ratas suplementadas con matcha.

Aunque en nuestro estudio la suplementación con matcha no generó una mayor expresión del gen *Bmp7* (inductor de la marronización), existen otros mecanismos que pueden desencadenar la diferenciación de adipocitos blancos hacia adipocitos beige (Lonze *et al.*, 2017). Se ha propuesto que las catequinas presentes en el matcha actúan como agonistas del PPAR- $\gamma$ , dando inicio a la

marronización del tejido adiposo blanco (Bolin *et al.*, 2020). Por lo tanto, se puede considerar que la inducción del gen *Bmp7* no es indispensable en el pardeamiento.

De igual manera, con el gen *Prdm16*, involucrado en la regulación y mantenimiento de fenotipo beige, se ha propuesto que su inducción no es esencial para la termogénesis. En cambio, mayores niveles de ARNm de *Pgc-1 $\alpha$*  conllevan incremento en la expresión de la proteína termogénica UCP-1, siendo el *Pgc-1 $\alpha$*  su principal inductor. Por ello, este gen desempeña un rol de mayor importancia en la marronización (García *et al.*, 2015).

Al revisar distintas investigaciones sobre marcadores genéticos de marronización, se encontraron similitudes y diferencias con los resultados de nuestro bioensayo. En el estudio de Bolin *et al.* (2020), donde utilizaron dieta de cafetería, analizaron el tejido adiposo subcutáneo y el grupo suplementado con té verde presentó mayor expresión del gen *Pgc-1 $\alpha$* . En cambio, el té verde no indujo la expresión del gen *Prdm16*.

En la investigación de Neyrinck *et al.* (2017), se reportó la inducción de los genes *Pgc-1 $\alpha$*  y *Prdm16* en ratones C57BL/6J macho que recibieron DAE junto con 0.5% de extracto de hojas de té verde. Con Chen *et al.* (2017), la expresión relativa de los genes *Bmp7*, *Pgc-1 $\alpha$*  y *Prdm16* fue mayor en los grupos con extracto de té verde (77.5 y 155 mg/kg/día), comparado con el grupo de DAE.

En nuestro estudio y en los previamente mencionados, se demuestra que el té verde y el matcha son capaces de inducir la expresión de genes relacionados con la marronización. En nuestra investigación solo el gen *Pgc-1 $\alpha$*  mostró una expresión significativa, revelando que debe emplearse una dosis mayor para revertir los efectos negativos de la dieta de cafetería, como en el caso de Bolin *et al.* (2020). No obstante, nuestros resultados sugieren que el matcha, al igual que los extractos de té verde, puede inducir marcadores de marronización.

En las variedades de té obtenidas de la planta *Camellia sinensis*, especialmente el té verde y el matcha, se tienen identificados distintos compuestos bioactivos. En el matcha destaca la presencia del aminoácido teanina, análogo del glutamato, del que se han reportado efectos ansiolíticos en modelos animales y ensayos clínicos (Unno *et al.*, 2018). También se encuentran presentes compuestos

fenólicos como la rutina, quercetina, mirecitina y catequinas, siendo estas últimas las de mayor abundancia y relevancia biológica (Koláčková *et al.*, 2019).

Dentro de los mecanismos antiobesidad de las catequinas, en especial la EGCG, se ha reportado la inducción de microARNs, como el miR-27a y el miR27b, lo que reduce la deposición lipídica en el adipocito (Lorente *et al.*, 2019). Otro mecanismo reportado es la fosforilación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), que a nivel del tejido adiposo blanco incrementa la sensibilidad a la insulina, permitiendo la mayor utilización de glucosa como sustrato energético. Además, la AMPK activa el gen *Pgc-1 $\alpha$* , que al mediar la biogénesis mitocondrial, incrementa la  $\beta$ -oxidación y acción de la proteína UCP-1 (Yang *et al.*, 2016).

Así como el té verde y matcha, otras matrices alimentarias de origen vegetal han mostrado actividad inductora de las vías de marronización. En la investigación de Cavalera *et al.* (2016), con ratones C57BL/6, un grupo fue alimentado con DAG, mientras que otro grupo recibió DAG suplementada con escaramujo (*Rosa eglanteria*) un fruto silvestre rico en compuestos fenólicos. La suplementación se realizó durante 3 meses con escaramujo pulverizado. Posteriormente, evaluaron la expresión génica en tejido adiposo subcutáneo, encontrando sobreexpresión del gen *Bmp7* en el grupo que recibió escaramujo. El gen *Pgc-1 $\alpha$*  también se encontraba con mayor expresión, pero no fue estadísticamente significativo. Por otra parte, el gen *Prdm16* tuvo menor expresión en el grupo suplementado.

En un modelo *in vitro* de Kang *et al.* (2019), con células 3T3-L1, se empleó ácido trans-cinámico, presente en la canela (*Cinnamomum cassia*). Tal compuesto se añadió en distintas concentraciones a los cultivos celulares, reportándose inducción de los genes *Prdm16* y *Pgc-1 $\alpha$*  a concentraciones de 50 a 200  $\mu$ M. Asimismo, los autores demostraron que el ácido trans-cinámico incrementó la expresión de dichos genes mediante la vía de la AMPK y por activación de receptores  $\beta$ 3-adrenérgicos.

En estos dos últimos estudios se aprecia que las vías y mecanismos de marronización, no son inducidos exclusivamente por las catequinas, ya que también pueden ser reguladas por distintos compuestos bioactivos de otras matrices alimentarias.

Es importante tener presente que el tejido adiposo blanco, además de almacenar reservas energéticas en forma de triacilgliceroles, desempeña un papel importante en el metabolismo mediante la producción de hormonas y moléculas señalizadoras. En la obesidad, al presentarse hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos, se altera el equilibrio en la producción de distintas adipoquinas, incrementándose la liberación de moléculas proinflamatorias (Francisqueti *et al.*, 2017).

Por su parte, la dieta de cafetería no solo induce obesidad, sino también provoca estrés oxidativo con disrupción del transcriptoma a nivel del tejido adiposo blanco (Johnson *et al.*, 2016), y promueve un estado inflamatorio en el hipotálamo, interfiriendo con el proceso de marronización (da Cruz *et al.*, 2018).

En general, la dieta de cafetería provoca mayores alteraciones a nivel antropométrico, bioquímico y genético que las dietas obesogénicas comerciales. En este sentido, los autores de futuras investigaciones deben considerar adoptar un modelo de obesidad inducida por la dieta que asemeje en mayor medida al patrón de dieta occidental, ampliamente distribuido en la población.

Por otro lado, se conocen algunas desventajas de emplear la dieta de cafetería en lugar de las dietas de comerciales, como la falta de estandarización y deficiencias nutricionales que puedan causar un sesgo en los resultados (Bortolin *et al.*, 2017). En nuestro estudio, la dieta de cafetería se preparó de forma homogénea, en lugar de administrar individualmente cada uno de sus componentes, teniendo mayor control de los macronutrientes y kilocalorías consumidas. Además, se incluyó una proporción de dieta estándar para evitar deficiencias nutricionales en las ratas y asegurar la confiabilidad de los resultados.

### 13. CONCLUSIONES

1. La suplementación de 100 mg/kg/día de matcha no revierte el estado obesogénico (peso e ingesta) ni hiperglucémico en ratas Wistar macho alimentadas con dieta de cafetería.
2. La menor ganancia de peso y la inducción del gen *Pgc-1 $\alpha$* , podrían sugerir que el matcha tiene un efecto antiobesogénico y puede inducir la marronización del tejido adiposo blanco. Sin embargo, dosis convencionales podrían no ser suficientes para restablecer los efectos negativos generados por el patrón de dieta y estilo de vida occidental.
3. El utilizar dieta de cafetería permite proponer que las alteraciones generadas, tanto en fenotipo como genotipo, necesitan de mayores dosis de suplementación con matcha para ser revertidas o aminoradas.

## 14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Achari, A. E. y Jain, S. K. (2017). Adiponectin, a therapeutic target for obesity, diabetes, and endothelial dysfunction. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1321-1338. <https://doi.org/10.3390/ijms18061321>
2. Adnan, M., Ahmad, A., Ahmed, D., Khalid, N., Hayat, I., Ahmed, I. (2013). Chemical composition and sensory evaluation of tea (*Camellia sinensis*) commercialized in Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, 45, 901–907. <http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/45%283%29/24.pdf>
3. Akmal, O. Z., Wan, G. W., Noordin, L., Mohd, Y. N., Mohamed, M. (2020). Phenolic compounds and the anti-atherogenic effect of bee bread in high-fat diet-induced obese rats. *Antioxidants*, 9(1), 4205–4212. <https://doi.org/10.3390/antiox9010033>
4. Altarejos, J. Y. y Montminy, M. (2011). CREB and the CRTC co-activators: sensor for hormonal and metabolic signals. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 12(3): 141–151. <https://doi.org/10.1038/nrm3072>
5. Andersen, M. L., y Winter, L. M. (2019). Animal models in biological and biomedical research – experimental and ethical concerns. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 91, 1–14. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720170238>
6. Andrade, O., V., Câmara, N. O., Moraes, V. P. (2015). Adipokines as drug targets in diabetes and underlying disturbances. *Journal of Diabetes Research*. 2015, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2015/681612>
7. Attademo, R. R., Rodrigues, B. P., Veloso, B. P., Campos, T. J., de Souza, V. L., Alberti, L. R. (2017). Effects of chronic consumption of green tea on weight and body fat distribution of Wistar rats evaluated by computed tomography1. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 32(5), 342–349. <https://doi.org/10.1590/s0102-865020170050000003>
8. Berry, R., Jeffery, E., Rodeheffer, M. S. (2014). Weighing in on adipocyte precursors. *Cell Metabolism*, 19(1), 8–20. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.10.003>
9. Bertholet, A. M., y Kirichok, Y. (2017). UCP1: A transporter for H<sup>+</sup> and fatty acid anions. *Biochimie*, 134, 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.10.013>

10. Bhattacharya, I., Domínguez, A. P., Dräger, K., Humar, R., Haas, E., Battegay, E. J. (2015). Hypoxia potentiates tumor necrosis factor- $\alpha$  induced expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in white and brown adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 461(2), 287–292. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.04.020>
11. Bhupathiraju, S. N., y Hu, F. B. (2016). Epidemiology of obesidad and diabetes and their cardiovascular complications. *Circulation Research*, 118(11), 1723–1735. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.04.020>
12. Bolin, A. P., Batista, S. F., Nascimento, D. G., Torres, F. L., Martins, A. P., Migliorini, F. A., Heleno, B. F., Otton, R. (2020). Adipogenic commitment induced by green tea polyphenols remodel adipocytes to a thermogenic phenotype. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 83, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2020.108429>
13. Bortolin, R. C., Vargas, A. R., Gasparotto, J., Chaves, P. R., Schnorr, C. E., Martinello, K. B., Silveira, A. K. (2018). A new animal diet based on human Western diet is a robust diet-induced obesity model: comparison to high-fat and cafeteria diets in term of metabolic and gut microbiota disruption. *International Journal of Obesity*, 42(3), 525–534. <https://doi.org/10.1038/ijo.2017.225>
14. Bray, G. A. y Siri, T. P. (2016). The role of macronutrient content in the diet for weight management. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 45(3), 581–604. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2016.04.009>
15. Bucco, S. M., Bernera, R. J., Pinto, I. A., Frasson, P. N., Chiapinotto, S. C., Schmidt, H. L., Mello, C. P., Weber, S. F. (2019). Comparative effect of *Camellia sinensis* teas on object recognition test deficit and metabolic changes induced by cafeteria diet. *Nutritional Neuroscience*, 22(8), 531–540. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2017.1418726>
16. Cavalera, M., Axling, U., Berger, K., Holm, C. (2016). Rose hip supplementation increases energy expenditure and induces browning of white adipose tissue. *Nutrition & Metabolism*, 13, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12986-016-0151-5>
17. Chen, L. H., Chien, Y. W., Liang, C. T., Chan, C. H., Fan, M. H., Huang, H. Y. (2017). Green tea extract induces genes related to browning of white adipose tissue and limits weight-gain in high energy diet-fed rat. *Food and Nutrition Research*, 61(1), 1–10. <https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1347480>
18. Contreras, C., Nogueiras, R., Diéguez, C., Medina, G. G., López, M. (2016). Hypothalamus and thermogenesis: heating the BAT, browning the WAT. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 438, 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.08.002>



19. Cortese, L., Terrazzano, G., Pelagalli, A. (2019). Leptin and immunological profile in obesity and its associated diseases in dogs. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10), 2392–2411. <https://doi.org/10.3390/ijms20102392>
20. da Cruz, R. K., Pereira, R. M., de Campos, T. D., de Moura, R. F., da Silva, A. S. (2018). The role of physical exercise to improve the browning of white adipose tissue via POMC neurons. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 1-7. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00088>
21. de Jong, J. M. A., Larsson, O., Cannon, B., Nedergaard, J. (2015). A stringent validation of mouse adipose tissue identity markers. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 308(12), 1085–1105. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00023.2015>
22. de la Iglesia, R., Loria-Kohen, V., Zulet, M. A., Martinez, J. A., Reglero, G., de Molina, A. R. (2016). Dietary strategies implicated in the prevention and treatment of metabolic syndrome. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(11), 1–21. <https://doi.org/10.3390/ijms17111877>
23. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018-19. Resultados nacionales (2020). *Instituto Nacional de Salud Pública*. <https://doi.org/10.21149/8593>
24. Dludla, P. V., Nkambule, B. B., Jack, B., Mkandla, Z., Mutize, T., Silvestri, S., Mazibuko-Mbeje, S. E. (2019). Inflammation and oxidative stress in an obese state and the protective effects of gallic acid. *Nutrients*, 11(1), 23–52. <https://doi.org/10.3390/nu11010023>
25. Fasshauer, M. y Blüher, M. (2015). Adipokines in health and disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, 36(7), 461–470. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.04.014>
26. Flegal, K. M., Shepherd, J. A., Looker, A. C., Graubard, B. I., Borrud, L. G., Ogden, C. L., Schenker, N. (2009). Comparisons of percentage body fat, body mass index, waist circumference, and waist-stature ratio in adults. *American Journal of Clinical Nutrition*, 89(3), 500–508. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.26847>
27. Francisqueti, F. V., Chiaverini, L. C., Dos Santos, K. C., Minatel, I. O., Ronchi, C. B., Ferron, A. J. T., Corrêa, C. R. (2017). The role of oxidative stress on the pathophysiology of metabolic syndrome. *Revista Da Associacao Medica Brasileira*, 63(1), 85–91. <https://doi.org/10.1590/1806-9282.63.01.85>
28. Fujioka, K. (2015). Safety and tolerability of medications approved for chronic weight management. *Obesity*, 23(1), 7–11. <https://doi.org/10.1002/oby.21094>

29. Fujioka, K., Iwamoto, T., Shima, H., Tomaru, K., Saito, H., Ohtsuka, M., Manome, Y. (2016). The powdering process with a set of ceramic mills for green tea promoted catechin extraction and the ROS inhibition effect. *Molecules*, 21(4), 474–486. <https://doi.org/10.3390/molecules21040474>
30. Gadde, K., Martin, C. K., Berthoud, H. R., Heymsfield, S. B. (2018). Obesity: Pathophysiology and Management. *Journal of The American College of Cardiology*, 71(1), 69-84. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.11.011>
31. Gamboa, G. C., Rocha, G. N., Gallegos, I. A., Moreno, J. M., Vázquez, C. B. (2015). Plants with potencial use on obesity and its complication. *EXCLI Journal*, 14, 809-831. <http://dx.doi.org/10.17179/excli2015-186>
32. García, R. A., Roemmich, J. N., Claycombe, K. J. (2016). Evaluation of markers of beige adipocytes in white adipose tissue of the mouse. *Nutrition & Metabolism*, 13(24), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12986-016-0081-2>
33. González, M. P., Martínez, G. M., Hu, F. B., Després, J. P., Matsuzawa, Y., Loos, R. J., Martínez, J. A. (2017). Obesity. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 1–18. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.34>
34. Heymsfield, S., Aronne, L. J., Eneli, I., Kumar, R. B., Michalsky, M., Walker, E. (2018). Clinical perspectives on obesity treatment: challenges, gaps, and promising opportunities. *National Academy of Medicine Perspectives*. 1–14. <https://doi.org/10.31478/201809b>
35. Huang, J., Wang, Y., Xie, Z., Zhou, Y., Zhang, Y., Wan, X. (2014). The anti-obesity effects of green tea in human intervention and basic molecular studies. *European Journal of Clinical Nutrition*. 68, 1075–1087. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2014.143>
36. Jakubczyk, K., Kochman, J., Kwiatkowska, A., Kałdńska, J., Dec., K., Kawczuga, D., Janda, K. (2020). Antioxidant properties and nutritional composition of matcha green tea. *Foods*, 9(4), 483–493. <https://doi.org/10.3390/foods9040483>
37. Johnson, A. R., Wilkerson, M. D., Sampey, B. P., Troester, M. A., Hayes, D. N., Makowski, L. (2016). Cafeteria diet-induced obesity causes oxidative damage in white adipose. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 473(2), 545–550. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.03.113>
38. Kaisanlahti, A. y Glumoff, T. (2019). Browning of white fat: agents and implications for beige adipose tissue to type 2 diabetes. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 75(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s13105-018-0658-5>

39. Kang, N. H., Mukherjee, S., Yun, J. W. (2019). Trans-cinnamic acid stimulates white fat browning and activates brown adipocytes. *Nutrients*, 11(3), 577–591. <https://doi.org/10.3390/nu11030577>
40. Kaur, G. y Kaur, P. (2019). Green tea (*Camellia sinensis*): It's promising health benefits for the welfare of humans. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(1), 299–302. <https://www.phytojournal.com/archives/2019/vol8issue1S/PartH/Sp-8-1-90-247.pdf>
41. Kiefer, F. W. (2016). Browning and thermogenic programing of adipose tissue. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, 30(4), 479–485. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2016.09.003>
42. Kochman, J., Jakubczyk, K., Antoniewicz, J., Mruk, H., Janda, K. (2021). Health benefits and chemical composition of matcha green tea: a review. *Molecules*, 26(1), 85–96. <https://doi.org/10.3390/molecules26010085>
43. Komes, D., Horžić, D., Belščak, A., Ganić, K. K., Vulić, I. (2010). Green tea preparation and its influence on the content of bioactive compounds. *Food Research International*, 43(1), 167–176. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.022>
44. Kumar, S. y Kelly, A. S. (2017). Review of Childhood Obesity: From Epidemiology, Etiology, and Comorbidities to Clinical Assessment and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings*, 92(2), 251–265. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2016.09.017>
45. Kwok, K. H., Lam, K. S., Xu, A. (2016). Heterogeneity of white adipose tissue: Molecular basis and clinical implications. *Experimental and Molecular Medicine*, 48(3), e215-e227. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.5>
46. Lee, Y. H., Mottillo, E. P., Granneman, J. G. (2014). Adipose tissue plasticity from WAT to BAT and in between. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1842(3), 358–369. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.05.011>
47. Leigh, S. J., Kendig, M. D., Morris, M. J. (2019). Palatable Western-style Cafeteria Diet as a Reliable Method for Modeling Diet-induced Obesity in Rodents. *Journal of Visualized Experiments*, (153). 1–10. doi:10.3791/60262
48. Lidell, M. E., Betz, M. J., Enerbäck, S. (2014). Brown adipose tissue and its therapeutic potential. *Journal of Internal Medicine*, 276(4), 364–377. <https://doi.org/10.1111/joim.12255>

49. Lorente, C. S., Herrera, K., Milagro, F. I., Sánchez, J., de la Garza, A. L., Castro, H. (2019). miRNAs and novel food compounds related to the browning process. *International Journal of Molecular Sciences*, 20 (23), 5998–6030. <https://doi.org/10.3390/ijms20235998>
50. Luo, L. y Liu, M. (2016). Adipose tissue in control of metabolism. *Journal of Endocrinology*, 231(3), 77–99. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0211>
51. Lutz, T. A. y Woods, S. C. (2012). Overview of animal models of obesity. *Current Protocols of Pharmacology*, 1–20. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0561s58>
52. Malik, V. S., Willet, W. C., Hu, F. B. (2013). Global obesity: trends, risk factors and policy implications. *Nature Reviews Endocrinology*, 9(1), 13–27. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2012.199>
53. Manna, P. y Jain, S. K. (2015). Obesity, oxidative stress, adipose tissue dysfunction, and the associated health risks: causes and therapeutic strategies. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 13(10), 423–444. <https://doi.org/10.1089/met.2015.0095>
54. Marcadenti, A. y de Abreu, S. E. (2015). Different adipose tissue depots: Metabolic implications and effects of surgical removal. *Endocrinología y Nutrición*, 62(9), 458–464. <https://doi.org/10.1016/j.endonu.2015.05.010>
55. Mozaffarian, D. (2016). Food and weight gain: time to end our fear of fat. *The Lancet Diabetes and Endocrinology*, 4(8), 633–635. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(16\)30106-1](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(16)30106-1)
56. Mulya, A. y Kirwan, J. P. (2016). Brown and beige adipose tissue: therapy for obesity and its comorbidities? *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 45(3), 605–621. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2016.04.010>
57. Neyrinck, A. M., Bindels, L. B., Geurts, L., Van Hul, M., Cani, P., Delzenne, N. M. (2017). A polyphenolic extract from green tea leaves activates fat browning in high-fat-diet-induced obese mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 49, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.07.008>
58. Nuttall, F. Q. (2015). Body mass index: Obesity, BMI, and health: A critical review. *Nutrition Today*, 50(3), 117–128. doi: 10.1097/NT.0000000000000092
59. Oz, H. S. (2017). Chronic inflammatory diseases and green tea polyphenols. *Nutrients*, 9(6), 561–575. <https://doi.org/10.3390/nu9060561>
60. Park, H. K. y Ahima, R. S. (2015). Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism. *Metabolism*, 64 (1), 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.08.004>

61. Pérez, E. R., Obbagy, J. E., Altman, J. M., Essery, E. V., McGrane, M. M., Wong, Y. P., Williams, C. L. (2012). Dietary energy density and body weight in adults and children: A systematic review. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 112(5), 671–684. <https://doi.org/10.1016/j.jand.2012.01.020>
62. Phongnarisorn, B., Orfila, C., Holmes, M., Marshall, L. J. (2018). Enrichment of biscuits with matcha green tea powder: Its impact on consumer acceptability and acute metabolic response. *Foods*, 7(2), 17–32. <https://doi.org/10.3390/foods7020017>
63. Ponrartana, S., Hu, H. H., Gilsanz, V. (2013). On the relevance of brown adipose tissue in children. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1302(1), 24–29. <https://doi.org/10.1111/nyas.12195>
64. Purnell J. Q. Definitions, classification, and epidemiology of obesity. [Updated 2018 Apr 12]. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al., editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDTText.com, Inc.; 2000-. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279167/?report=reader>
65. Richard, J. E., López, F. L., Chanclón, B., Eerola, K., Micallef, P., Skibicka, K. P., Wernstedt, A., I. (2017). CNS  $\beta$ 3-adrenergic receptor activation regulates feeding behavior, white fat browning, and body weight. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 313(3), 344–358. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00418.2016>
66. Robertson, S. H. y Rasmussen, E. B. (2017). Effects of a cafeteria diet on delay discounting in adolescent and adult rats: Alterations on dopaminergic sensitivity. *Journal of Psychopharmacology*, 31(11), 1419–1429. <https://doi.org/10.1177/0269881117735750>
67. Rodrigues, K. C., Pereira, R. M., de Campos, T. D., de Moura, R. F., da Silva, A. S., Cintra, D. E., de Moura, L. P. (2018). The role of physical exercise to improve the browning of white adipose tissue via POMC neurons. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 88–95. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00088>
68. Sanchez, G. J., Hung, C. M., Guertin, D. A. (2016). Emerging Complexities in Adipocyte Origins and Identity. *Trends in Cell Biology*, 26(5), 313–326. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.01.004>
69. Saric, S., Notay, M., Sivamani, R. K. (2017). Green tea and other tea polyphenols: Effects on sebum production and acne vulgaris. *Antioxidants*, 6(1), 2–18. <https://doi.org/10.3390/antiox6010002>

70. Savini, I., Catani, M. V., Evangelista, D., Gasperi, V., Avigliano, L. (2013). Obesity-associated oxidative stress: strategies finalized to improve redox state. *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (5), 10497–10538. <https://doi.org/10.3390/ijms140510497>
71. Seidell, J. C. y Halberstadt, J. (2015). The global burden of obesity and the challenges of prevention. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 66(2), 7–12. <https://doi.org/10.1159/000375143>
72. Sellayah, D., Cagampang, F. R., Cox, R. D. (2014). On the evolutionary origins of obesity: A new hypothesis. *Endocrinology*, 155(5), 1573–1588. <https://doi.org/10.1210/en.2013-2103>
73. Senanayake, P. D., Mohotti, K., Paranagama, P. A. (2015). Bioactive constituents of wood rot extract of tea, *Camellia sinensis* L.O. Kuntze against alates of low country live wood termite *Glyptotermes dilatatus* Bugnion and Popoff (Isoptera: Kalotermitidae). *SpringerPlus*, 4(1), 711–720. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1513-6>
74. Sharkey, F. H., Banat, I. M., Marchant, R. (2004). Detection and quantification of gene expression in environmental bacteriology. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7), 3795–3806. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.7.3795-3806.2004>
75. Shinoda, K., Luijten, I. H., Hasegawa, Y., Hong, H., Sonne, S. B., Kim, M. (2015). Genetic and functional characterization of clonally derived adult human Brown adipocytes. *Nature Medicine*. 21(4), 389–394. <https://doi.org/10.1038/nm.3819>
76. Shrivastava, R. R., Pateriya, P., Singh, M. (2018). Green tea - A short review. *International Journal of Indigenous Herbs and Drugs*, 3(2), 12–21. <https://www.saap.org.in/journals/index.php/herbsanddrugs/article/view/70/62>
77. Stanford, K. I., Hua, T. Y., Goodyear, L. J. (2013). Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(1), 215–223. <https://doi.org/10.1172/JCI62308>
78. Stanford, K. I., Middelbeek, R. J., Goodyear, L. J. (2015). Exercise effects on white adipose tissue: Beiging and metabolic adaptations. *Diabetes*, 64(7), 2361–2368. <https://doi.org/10.2337/db15-0227>
79. Tchkonja, T., Thomou, T., Zhu, Y., Karagiannides, I., Pothoulakis, C., Jensen, M. D., Kirkland, J. L. (2013). Mechanisms and metabolic implications of regional differences among fat depots. *Cell Metabolism*, 17(5), 644–656. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.03.008>

80. Topuz, A., Dinçer, C., Torun, M., Tontul, I., Şahin-Nadeem, H., Haznedar, A., Özdemir, F. (2014). Physicochemical properties of Turkish green tea powder: Effects of shooting period, shading, and clone. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 38(2), 233–241. doi:10.3906/tar-1307-17
81. Torres, N., Vargas, C. A., Tovar, A. R. (2016). Adipose tissue: White adipose tissue structure and function. *Encyclopedia of Food and Health*. 35-42. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00006-4>
82. Unno, K., Furushima, D., Hamamoto, S., Iguchi, K., Yamada, H., Morita, A., Nakamura, Y. (2018). Stress-reducing function of matcha green tea in animal experiments and clinical trials. *Nutrients*, 10(10), 1468–1482. <https://doi.org/10.3390/nu10101468>
83. Vomelová, I., Vanícková, Z., Sedo, A. (2009). Methods of RNA purification. All ways (should) lead to Rome. *Folia Biologica*, 55(6), 243–251. [https://fb.cuni.cz/Data/files/fovia\\_biologica/volume\\_55\\_2009\\_6/fb2009A0037.pdf](https://fb.cuni.cz/Data/files/fovia_biologica/volume_55_2009_6/fb2009A0037.pdf)
84. Warolin, J., Coenen, K. R., Kantor, J. L., Whitaker, L. E., Wang, L. (2014). The relationship of oxidative stress, adiposity, and metabolic risk factors in healthy black and white youth. *Pediatric Obesity*, 9(1), 43–52. <https://doi.org/10.1111/j.2047-6310.2012.00135.x>
85. Weiss, D. J. y Anderton, C. R. (2003). Determination of catechins in matcha green tea by micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1011(1-2), 173–180.
86. Willems, M. E., Fry, H. L., Belding, M. A., Kaviani, M. (2020). Three weeks daily intake of matcha green tea powder affects substrate oxidation during moderate-intensity exercise in females. *Journal of Dietary Supplements*, 18(5), 566–576. <https://doi.org/10.1080/19390211.2020.1811443>
87. World Health Organization. (16 de Febrero de 2018). *Obesity and overweight*. Recuperado el 12 de Octubre de 2019, de WHO | World Health Organization: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
88. Xu, P., Ying, L., Hong, G. (2016). The effects of the aqueous extract and residue of matcha on the antioxidant status and lipid and glucose levels in mice fed a high-fat diet. *Food & Function*, 7(1), 294–300. <https://doi.org/10.1039/C5FO00828J>
89. Yamabe, N., Sung, K. K., Moon, H. J., Yokozawa, T. (2009), Matcha, a powdered green tea, ameliorates the progression of renal and hepatic damage in type 2 diabetic OLETF rats. *Journal of Medicinal Food*, 12(4), 714-721. <https://doi.org/10.1089/jmf.2008.1282>

90. Yamashita, Y., Mitani, T., Wang, L., Ashida, H. (2018). Methylxanthine derivative-rich cacao extract suppresses differentiation of adipocytes through downregulation of PPAR $\gamma$  and C/EBPs. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 64(2), 151–160. <https://doi.org/10.3177/jnsv.64.151>
91. Yamashita, Y., Wang, L., Wang, L., Tanaka, Y., Zhang, T., Ashida, H. (2014). Oolong, black and pu-erh tea suppresses adiposity in mice via activation of AMP-activated protein kinase. *Food and Function*, 5(10), 2420–2429. doi: 10.1039/c4fo00095a
92. Yang, C. S., Zhang, J., Zhang, L., Huang, J., Wang, Y. (2016). Mechanisms of body weight reduction and metabolic syndrome alleviation by tea. *Molecular Nutrition & Food Research*, 60(1), 160–174. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500428>
93. Zechner, R., Zimmermann, R., Eichmann, T. O., Kohlwein, S. D., Haemmerle, G., Lass, A., Madeo, F. (2012). Fat signals - Lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. *Cell Metabolism*, 15(3), 279–291. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.12.018>
94. Zhao, C. W., Gao, Y. H., Song, W. X., Liu, B., Ding, L., Dong, N., Qi, X. (2019). An update on the emerging role of resistin on the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators of Inflammation*, 2019, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2019/1532164>
95. Zhou, J., Lin, H., Xu, P., Yao, L., Xie, Q., Mao, L., Wang, Y. (2020). Matcha green tea prevents obesity-induced hypothalamic inflammation via suppressing the JAK2/STAT3 signaling pathway. *Food & Function*, 11(10), 8987–8995. doi: 10.1039/d0fo01500h
96. Zwick, R. K., Guerrero, J. C., Horsley, V., Plikus, M. V. (2018). Anatomical, Physiological, and Functional Diversity of Adipose Tissue. *Cell Metabolism*, 27(1), 68–83. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.12.002>